

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
17. Januar 2002 (17.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/04664 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68**

Universitätsklinik, Im Neuenheimer Feld 110, 69120
Heidelberg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/DE01/02510**

(74) **Anwalt: HUBER, Bernard**; Huber & Schüssler, Trud-
eringer Strasse 246, 81825 München (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
4. Juli 2001 (04.07.2001)

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) **Angaben zur Priorität:**
100 32 608.0 7. Juli 2000 (07.07.2000) **DE**

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(71) **Anmelder und**

(72) **Erfinder: KNEBEL DOEBERITZ, von, Magnus**
[DE/DE]; Chirurgische Universitätsklinik, Sektion
Molekulare Diagnostik und Therapie, Im Neuenheimer
Feld 110, 69120 Heidelberg (DE).

(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder (nur für US): BORK, Peer** [DE/DE];
Maxerhofstr. 1, 69118 Heidelberg (DE). **YUAN, Yan,**
Ping [DE/DE]; Mayerhofstr. 1, 69118 Heidelberg (DE).
GEBERT, Johannes [DE/DE]; Chirurgische Universitäts-
klinik, Im Neuenheimer Feld 110, 69120 Heidelberg
(DE). **WÖRNER, Stefan** [DE/DE]; Chirurgische Univer-
sitätsklinik, Im Neuenheimer Feld 110, 69120 Heidelberg
(DE). **LINNEBACHER, Michael** [DE/DE]; Chirurgische

Veröffentlicht:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

(54) **Title:** GENES AND THEIR GENETIC PRODUCTS PERTINENT TO MICROSATELLITE INSTABLE (MSI+) TUMOURS

(54) **Bezeichnung:** FÜR MIKROSATELLITENINSTABILE (MSI+)-TUMORE RELEVANTE GENE UND IHRE GENPRO-
DUKTE

(57) **Abstract:** The invention relates to genes comprising coding mononucleotide microsatellites (cMNR) or dinucleotide microsatel-
lites (cDNR). The genes can be isolated from MSI+ tumour cells. Said genes differ from corresponding genes from non-MSI+ (tu-
mour) cells by mutations in the cMNR or cDNR and code for gene products including neopeptides. The invention also relates to the
use of the genes and their gene products for the prevention, diagnosis and/or therapy of MSI+ tumours.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft Gene mit kodierenden Mononukleotid-Mikrosatelliten (cMNR) oder
Dinukleotid-Mikrosatelliten (cDNR), wobei die Gene aus MSI+ -Tumorzellen isolierbar sind und sich von den entsprechenden
Genen aus nicht-MSI+(Tumor)zellen durch Mutationen in den cMNR oder cDNR unterscheiden und für Neo-Peptide umfassende
Genprodukte kodieren. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der Gene bzw. deren Genprodukte zur Prävention, Diagnose
und/Therapie von MSI+ -Tumoren.

BEST AVAILABLE COPY

**Für mikrosatelliteninstabile (MSI+)-Tumore
relevante Gene und ihre Genprodukte**

Die vorliegende Erfindung betrifft Gene, die für MSI+ -Tumore relevant sind, und ihre Genprodukte. Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung solcher Gene und die Verwendung der Gene bzw. deren Genprodukte zur Prävention, Diagnose und/oder Therapie von MSI+ -Tumoren.

Tumorzellen akkumulieren Instabilitäten (Mutationen) in Genen, die für die Aufrechterhaltung eines normalen Wachstums und einer normalen Differenzierung essentiell sind. In menschlichen Tumoren wurden zwei Arten genetischer Instabilität identifiziert: Chromosomale Instabilität (CIN) und Mikrosatelliten-Instabilität (MSI), wobei letztere durch Längenvariationen repetitiver DNA-Sequenzen in diploiden Tumorzellen gekennzeichnet ist. Der Typ und das Spektrum mutierter Gene unterscheidet sich stark zwischen CIN- und MSI+ -Tumoren, was auf verschiedene, jedoch sich nicht gegenseitig ausschließende Wege der Krebsentstehung hindeutet. MSI tritt in etwa 90% von erblichen nicht-polypösen-kolorektalen Tumoren (HNPCC) auf sowie in etwa 15% von sporadischen Tumoren des Dickdarms und weiterer Organe und wird durch eine Mutations-bedingte Inaktivierung unterschiedlicher DNA-Mismatchreparatur-Gene hervorgerufen. MSI+ -Tumore weisen besondere histopathologische Merkmale auf. Auch werden MSI+ -Tumore einer Klassifizierung unterworfen, für die in der Regel Mikrosatelliten in nicht-kodierenden Bereichen oder Intronsequenzen herangezogen werden. Hinweise existieren allerdings, daß auch Mikrosatelliten in kodierenden Genbereichen einer Instabilität unterliegen. Dies könnte eine große Bedeutung für die Tumorgenese von MSI+ -Tumo-

ren haben.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit das technische Problem zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem MSI+ -Tumore auf molekularer Ebene untersucht werden können und das sich gegebenenfalls zur Diagnose und/oder Therapie von MSI+ -Tumoren eignet.

Erfindungsgemäß wird dieses technische Problem durch die Gegenstände in den Patentansprüchen gelöst.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis des Anmelders, daß in MSI+ -Tumoren kodierende Mononukleotid-Mikrosatelliten (cMNR) enthaltende Gene vielfach in ihren cMNR Instabilitäten (Mutationen) aufweisen. Hierzu hat er mittels einer Computer-Algorithmus-gestützten Datenbankanalyse ca. 17000 kodierende Mononukleotid-Mikrosatelliten (cMNR) und ca. 2000 kodierende Dinukleotid-Mikrosatelliten (cDNR) identifiziert, die aus Repeat-Einheiten mit $n \geq 6$ bzw. $n \geq 4$ bestehen. Die genetische Instabilität von 15 cMNR ($n \geq 9$) und 4 cDNR ($n \geq 5$) und die Expression der entsprechenden Gene wurden in 16 MSI+ - und 20 nicht-MSI+ Tumoren und Zelllinien untersucht, wobei bei diesen Analysen eine Fokussierung auf lange Repeateinheiten erfolgte. Die cMNR bzw. cDNR zeigten Instabilitäts(Mutations)häufigkeiten, die in MSI+ - Tumorzellen von 1 - 100% reichten, in nicht-MSI+(Tumor)zellen waren die cMNR bzw. cDNR jedoch stabil. Die meisten cMNR enthaltenden Gene (10 von 15 = 66%) wurden in allen MSI+ - und nicht-MSI+(Tumor)zellen hoch exprimiert, wobei keine signifikante Korrelation zwischen dem Expressionsspiegel und der Mutationshäufigkeit beobachtet werden konnte. Darüber hinaus hat er gefunden, daß die instabilen cMNR bzw. cDNR tragenden Gene für Neo-Peptide umfassende Genprodukte kodieren und daß sich diese Genprodukte zur Immunisierung eines Individuums gegen MSI+ -Tumore bzw. ihre Vorstufen eignen. Es wird auf die Figuren 1-3, Tabellen 1-3 und die nachstehenden Beispiele verwiesen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit Gene mit kodierenden Mononukleotid-Mikrosatelliten (cMNR) oder Dinukleotid-Mikrosatelliten (cDNR), wobei die Gene aus MSI+ - Tumorzellen isolierbar sind und sich von den entsprechenden Genen aus nicht-MSI+(Tumor)zellen durch Mutationen in den cMNR oder cDNR unterscheiden und für Neo-Peptide umfassende Genprodukte kodieren.

Der Ausdruck "kodierende Mononukleotid-Mikrosatelliten" umfaßt Repeat-Einheiten von mindestens drei gleichen Mononukleotiden A, T, G oder C ($n \geq 3$), wobei die Repeat-Einheiten in kodierenden Gen-Bereichen vorliegen.

Der Ausdruck "kodierende Dinukleotid-Mikrosatelliten" umfaßt Repeat-Einheiten von mindestens drei gleichen Dinukleotiden (AC, AG, AT, CA, CG, CT, GA, GC, GT, TA, TC, TG, $n \geq 3$), vorzugsweise von mindestens sechs ($n \geq 6$) und ganz besonders bevorzugt von mindestens neun ($n \geq 9$), wobei die Repeat-Einheiten in kodierenden Gen-Bereichen liegen.

Der Ausdruck "Gene mit mutierten cMNR oder cDNR", die aus MSI+ -Tumorzellen isolierbar sind, umfaßt solche Gene in vollständiger Länge, wie auch die Mutationen und die für die Neo-Peptide kodierenden Sequenzen enthaltende Teile davon.

Der Ausdruck "MSI+ -Tumorzellen" umfaßt jegliche Tumorzellen, die eine Mikrosatelliten-Instabilität aufweisen. Solche Tumorzellen können in jeglicher Form, z.B. in einem Verband von Zellen, insbesondere in einem Tumor, oder als solche in Kultur gehalten, vorliegen. Bevorzugte MSI+ - Tumorzellen umfassen die Zelllinien LoVo, KM12, HCT116, LS174 und SW48.

Der Ausdruck "nicht-MSI+(Tumor)zellen" umfaßt jegliche Zellen, die keine Mikrosatelliten-Instabilität aufweisen. Solche Zellen können jeglicher Art und Abstammung sein, z.B. können die Zellen von gesunden Individuen oder aus Tumoren stammen, bzw.

Tumor-Zelllinien sein.

Die Ausdrücke "Mutationen" und "Neo-Peptide umfassende Genprodukte" weisen darauf hin, daß in den kodierenden Mikrosatelliten (cMNR oder cDNR) von aus MSI+ -Tumorzellen isolierbaren Genen Mutationen im Vergleich zu den cMNR oder cDNR der entsprechenden Gene aus nicht-MSI+(Tumor)zellen vorliegen, wobei die Mutationen derart sind, daß die Gene für Neo-Peptide umfassende Genprodukte kodieren. Beispielsweise stellen sich die Mutationen als Insertionen und/oder Deletionen von einem oder mehreren Mono- bzw. Dinukleotiden dar. Die Mutationen führen zu Leserahmenverschiebungen derart, daß die Genprodukte in Form von Neo-Peptide, d.h. neugenerierte Peptide, umfassenden Genprodukten vorliegen.

In bevorzugter Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Gene solche, die sich von den in Fig. 1 angegebenen Genen aus nicht-MSI+(Tumor)zellen durch Mutationen in den cMNR oder cDNR unterscheiden und für Neo-Peptide umfassende Genprodukte kodieren. Ganz besonders weisen die erfindungsgemäßen Gene die in Fig. 2 angegebenen Mutationen in den cMNR oder cDNR auf und kodieren für die angegebenen Neo-Peptide umfassenden Genprodukte.

Erfindungsgemäße Gene können durch verschiedene Verfahren identifiziert und bereitgestellt werden. Günstig ist ein Verfahren, bei dem man in Datenbanken von nicht-MSI+(Tumor)zellen nach kodierende Mononukleotid-Mikrosatelliten (cMNR) oder Dinukleotid-Mikrosatelliten (cDNR) enthaltenden Gen-Sequenzen sucht, diese zur Auffindung gleicher Gene in MSI+ -Tumorzellen verwendet und letztere Gene dahingehend selektioniert, daß sie gegenüber den Gen-Sequenzen aus den nicht-MSI+(Tumor)zellen Mutationen in den cMNR oder cDNR aufweisen und für Neo-Peptide umfassende Genprodukte kodieren. Von Vorteil ist es, wenn zur Auffindung der Gene in den MSI+ - Tumorzellen DNA dieser einer PCR-Reaktion mit Primern unterzogen wird, die aus den cMNR oder

cDNR umfassenden Gen-Sequenzen entwickelt sind. Vorzugsweise umfassen die Primer die in Tabelle 1 angegebenen Sequenzen. Ferner ist es günstig, hinsichtlich der Selektion der Gene aus den MSI+ -Tumorzellen auf solche zu selektionieren, die in MSI+ -Tumorzellen von verschiedenen MSI+ -Tumoren gleichen Typs mit einer Häufigkeit von ca. 1 % - 100% vorliegen. Des weiteren ist es vorteilhaft zur Isolierung der Gene aus den MSI+ -Tumorzellen die entsprechenden Gen-Sequenzen aus der Datenbank zur Erstellung geeigneter Primer zu verwenden und mit diesen die Gene in den MSI+ -Tumorzellen zu amplifizieren. Eine Klonierung der amplifizierten Gene und ihre Expressionen können dann durch übliche Verfahren erfolgen. Als Vektoren zur Expression in E.coli sind z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8 zu nennen. Ferner sind für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4 sowie für die Expression in Insektenzellen z.B. der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A, anzuführen. Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um die in den Expressionsvektoren vorliegenden Gene zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli Stämme HB101, DH 1, x1776, JM101, JM109, BL21 und SG13009, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae* und die tierischen Zellen L, NIH 3T3, FM3A, CHO, C05, VERO und HeLa sowie die Insektenzellen sfg. Des weiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. transfizierte Zellen zu kultivieren und die exprimierten Genprodukte zu isolieren und zu reinigen. Ergänzend wird auf Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY (1989) verwiesen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Genprodukte, die durch die vorstehenden Gene kodiert sind. Es wird auf die vorstehenden Ausführungen hinsichtlich der erfindungsgemäßen Gene verwiesen. Diese Ausführungen gelten entsprechend für die erfindungsgemäßen Genprodukte. Insbesondere handelt es sich um solche Genprodukte, die sich durch Mutationen in den durch die cMNR oder cDNR kodierten Bereiche

von jenen Genprodukten der in Fig. 1 angegebenen Gene unterscheiden und Neo-Peptide umfassen. Ganz besonders umfassen die Genprodukte die durch die in Fig. 2 angegebenen cMNR oder cDNR bedingten Mutationen und weisen die angegebenen Neo-Peptide auf. Zur Bereitstellung der vorstehenden Genprodukte können übliche Verfahren verwendet werden. Es wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Auch kann es günstig sein, die Neo-Peptide als solche, insbesondere mittels Peptidsynthese bereitzustellen. Ergänzend wird auf Sambrook et al., supra verwiesen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Antikörper, die gegen die vorstehenden Genprodukte gerichtet sind. Es wird auf die vorstehenden Ausführungen hinsichtlich der Genprodukte verwiesen. Diese Ausführungen gelten entsprechend für die erfindungsgemäßen Antikörper. Vorzugsweise handelt es sich bei diesen Antikörpern um monoklonale, polyklonale oder synthetische Antikörper oder Fragmente davon. In diesem Zusammenhang bedeutet der Begriff „Fragment“ alle Teile des monoklonalen Antikörpers (z.B. Fab-, Fv- oder „single chain Fv“-Fragmente), welche die gleiche Epitopspezifität wie der vollständige Antikörper aufweisen. Die Herstellung solcher Fragmente ist dem Fachmann bekannt. Vorzugsweise handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Antikörpern um monoklonale Antikörper. Die erfindungsgemäßen Antikörper können gemäß Standardverfahren hergestellt werden, wobei vorzugsweise die vorstehenden Genprodukte als Immunogen dienen. Verfahren zur Gewinnung monoklonaler Antikörper sind dem Fachmann bekannt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Kits, die sich zur Untersuchung auf molekularer Ebene von MSI+-Tumoren sowie zu deren Diagnose eignen. Ferner eignen sich die Kits zur Identifizierung von für MSI+ -Tumore relevanten Genen. Solche Kits umfassen einen oder mehrere Vertreter eines erfindungsgemäßen Gens, Genprodukts, Antikörpers und/oder Primerpaares. Es wird auf die vorstehenden Ausführungen hinsichtlich

erfindungsgemäßer Gene, Genprodukte und Antikörper verwiesen. Ferner können die Kits weitere Substanzen, wie reverse Transkriptase, DNA-Polymerase, Ligase, Puffer und Reagenzien, z.B. Markierungen, dNTPs, enthalten. Des weiteren können die erfindungsgemäßen Gene, Genprodukte, Antikörper und/oder Primerpaare markiert sein. Auch können sie frei vorliegen oder an einen festen Träger, z.B. ein Teströhrchen, eine Mikrotiterplatte, ein Teststäbchen, etc., immobilisiert sein. Die Kits können weiterhin geeignete Reagenzien zum Nachweis von Markierungen oder zur Markierung positiver und negativer Kontrollen, Waschlösungen, Verdünnungspuffer, etc. enthalten.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verfahren zur Immunisierung eines Individuums gegen MSI+ -Tumore und ihre Vorstufen, bei dem dem Individuum ein vorstehendes Gen in exprimierbarer Form oder ein durch dieses kodierte Genprodukt verabreicht wird. Es wird auf die vorstehenden Ausführungen hinsichtlich erfindungsgemäßer Gene und Genprodukte verwiesen.

Für die Verabreichung eines vorstehenden Gens kann dieses als RNA oder DNA, vorzugsweise als DNA vorliegen. Ferner kann es als solches, d.h. zusammen mit für seine Expression geeigneten Elementen, oder in Verbindung mit einem Vektor vorliegen. Beispiele solcher Elemente sind Promotoren und Enhancer, wie CMV-, SV40-, RSV-, Metallothionein I und Polyhedrin-Promotor bzw. CMV- und SV40-Enhancer. Weitere für die Expression geeignete Sequenzen gehen aus Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) hervor. Darüberhinaus können als Vektoren jegliche für die Expression in Säugerzellen geeignete Vektoren verwendet werden. Dies sind z.B. pcDNA3, pMSX, pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4 sowie von pcDNAI/amp, pcDNAI/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo und pHyg stammende Vektoren. Auch können als Vektoren rekombinante Viren, z.B. Adenovirus, Vaccinia-Virus oder Adeno-assoziiertes

Virus, verwendet werden.

Für die Verabreichung eines vorstehenden Genproduktes kann dieses als solches oder in Verbindung mit Trägern vorliegen. Günstig ist es, wenn die Träger im Individuum nicht als immunogen wirken. Solche Träger können Individuum-eigene oder -fremde Proteine bzw. Fragmente davon sein. Bevorzugt sind Träger, wie Serumalbumin, Fibrinogen oder Transferrin bzw. ein Fragment davon.

Mit einem vorstehenden Gen in exprimierbarer Form oder einem durch dieses kodierten Genprodukt kann ein Individuum immunisiert werden, das an einem MSI+ -Tumor erkranken kann oder bereits an einem solchen erkrankt ist. Beispiele eines solchen Individuums sind der Mensch und das Tier sowie Zellen von diesen. Die Immunisierung kann unter üblichen Bedingungen erfolgen, wobei die Menge des zu verabreichenden Gens bzw. des durch dieses kodierten Genproduktes leicht zu bestimmen ist. Sie hängt u.a. davon ab, ob die Immunisierung des Individuums mehr auf eine Induktion von gegen das Genprodukt gerichteten Antikörpern oder auf eine Stimulierung von gegen das Genprodukt gerichteten cytotoxischen T-Zellen, z.B. $CD8^+$ T-Zellen, abzielt. Beide Möglichkeiten der Immunisierung können durch die vorliegende Erfindung erreicht werden. Desweiteren hängt die Menge davon ab, ob die Immunisierung als prophylaktische oder therapeutische Behandlung beabsichtigt ist. Darüber hinaus spricht das Alter, das Geschlecht und das Gewicht des Individuums sowie weitere klinische Parameter, z.B. Nieren-/Leberfunktion, eine Rolle für die Bestimmung der Menge. Günstig ist es, wenn dem Individuum $100\mu\text{g}$ - 1 g eines vorstehenden Genproduktes bzw. 10^6 - 10^{12} infektiöse Partikel eines rekombinanten, ein vorstehendes exprimierbares Gen enthaltenden Virus injiziert werden. Die Injektion kann an mehreren Stellen des Individuums intramuskulär, subkutan, intradermal oder in jeder anderen Applikationsform erfolgen. Ferner kann es günstig sein, ein oder mehrere "Booster-

Injektionen" mit ca. gleicher Menge durchzuführen.

Somit ermöglicht es die vorliegende Erfindung, MSI+ -Tumore diagnostisch zu erfassen. Ferner können diese Tumore auch prophylaktisch und therapeutisch angegangen werden.

Kurze Beschreibung der Figuren:

Figur 1:

Gene mit cMNR oder cDNR aus nicht-MSI+ -(Tumor)zellen

Figur 2:

Mutationen in cMNR oder cDNR aus MSI+-Tumoren und daraus resultierende Neo-Peptide. Ferner ist der Vergleich mit entsprechenden Genen aus nicht-MSI+(Tumor)zellen gezeigt.

Figur 3:

Untersuchung der mRNA-Expression in Dickdarmkrebs-Zelllinien über RT-PCR

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1: Allgemeine Verfahren

(A) Datenbank-Analysen

Für die Suche nach Mononukleotid- und Dinukleotid-Repeats in menschlichen kodierenden Sequenzen wurde die EMBL-Datenbank-Veröffentlichung (EMBL Rel.62, März 2000) zugrundegelegt. Eine Anzahl von Befehlsroutinen bzw. Programmen, sog. „Perl scripts“ (Wall et al., Programming Perl. O'Reilly & Associates, Inc., (1996)) wurde geschrieben, die alle menschlichen 109289-EMBL-Einträge hinsichtlich der Anwesenheit von kodierenden Sequenzen überprüften. Diese kodierenden Sequenzen wurden hinsichtlich der Anwesenheit von Mononukleotid- und Dinukleotid-Repeats mit mindestens 6 Basen (im Fall von Mononukleotid-Repeats) bzw. 8 Basen (im Fall von Dinukleotid-Repeats überprüft. Lediglich der

längste Repeat jedes Nukleotidtyps bei einem Datenbankeintrag-Kandidaten wurde als Mononukleotid-Repeat aufgezeichnet. Hinsichtlich der Dinukleotid-Repeats wurden alle 12 unterschiedlichen Arten von Dinukleotid-Repeats berücksichtigt. Einträge für cDNA und genomische DNA wurden getrennt behandelt; falls beide DNA-Arten für ein Gen zur Verfügung standen, wurde der genomischen Sequenz Priorität gegeben. Zusätzlich wurden verschiedene Filter verwendet. Beispielsweise wurden als Pseudogene ausgewiesene Einträge ausgeschlossen, da Pseudogene in der Regel nicht transkribiert werden. Somit handelt es sich bei solchen Repeats um nicht-kodierende Mikrosatelliten. Alle identifizierten Kandidaten-Sequenzen wurden in einer relationalen Datenbank für weitere Analysen gespeichert.

(B) Analyse von cMNR- und cDNR-Kandidatenlisten

Um die Analyse ungeeigneter Kandidaten-Sequenzen zu vermeiden, wurden alle Kandidaten ausgeschlossen, von denen bekannt war, dass es sich um Pseudogene oder Mitglieder der Immunglobulin-Familie handelt. Außerdem wurden alle Kandidaten ausgeschlossen, die die Repeats am äußersten 5'- oder 3'-Ende der bekannten Sequenz aufwiesen, sowie alle cMNR oder cDNR, die bei näherer Analyse der Primärdaten als Klonierungs- oder Sequenzierungsartefakte identifiziert werden konnten. Es wurden alle cMNR mit mehr als 9 A- und T-Repeats und alle C- oder G-Repeats mit 9 Repeat-Einheiten selektiert, da die Wahrscheinlichkeit der Mikrosatelliten-Instabilität in Tumoren mit dem Mutator-Phänotyp mit der Anzahl der Repeat-Einheiten ansteigt (Strauss et al., Nucleic Acids Res. 25 (1997), 806-813). Im Anschluß daran wurden zwei voneinander unabhängige BLAST-Analysen durchgeführt (Altschul et al., Nuc. Ac. Res. 25 (1997), 3389-3402). Somit wurde versucht, homologe als auch genomische Sequenzen zu identifizieren, um so die Exon/Intron-Übergänge der ausgewählten cDNAs identifizieren zu können, was die Bestätigung dafür gestattete, dass der Repeat-Bereich in der cDNA nicht aufgrund eines Splicing-Prozesses entstanden war. In einigen Fällen wurden Unterschiede zwischen den Repeat-

Sequenzen der cDNAs und denen von anderen veröffentlichten Sequenzen genau in dem Repeat-Bereich erhalten. Folglich mußte zur Verifizierung der Sequenzinformation in jedem Repeat-Bereich die genomische DNA sequenziert werden. Exon/Intron-Übergänge wurden durch MALIGN-Analyse (HUSAR-Software-Programmpaket) einer Kandidaten-cDNA und einer homologen genomischen DNA-Sequenz identifiziert.

(C) Zelllinien und Tumorproben

14 menschliche Dickdarmkrebszelllinien wurden hinsichtlich Mikrosatelliten-Änderungen in jedem vorstehenden Gen untersucht. Fünf der 14 Dickdarmkrebszelllinien sind als MSI+ klassifiziert (LoVo, KM12L4, HCT116, LS174T und SW48), während neun Zelllinien als MSI-niedrig oder MSI-negativ klassifiziert sind (CXF94, SW948, LS180, SW707, CaCo-2, HT29, Colo320DM, SW480 und CX-2). Die Zelllinien SW48 und HCT 116 wurden von der ECACC [<http://www.camr.org.uk/frame.htm>] bezogen. Die Linien HT29, SW707, SW948, CaCo 2, CX-2, CXF94, SW480, COLO320DM, LoVo, LS174T, und LS180 wurden durch die Tumorbank des Deutschen Krebsforschungszentrums bezogen. KM12L4 Zellen wurden von Dr. I.J. Fidler, MD Anderson Cancer Center, Houston, USA zur Verfügung gestellt. Ferner wurden 10 MSI+ CRC-Tumore analysiert, ein MSI+ Eierstocktumor (B190 TU) und zwei MSI-niedrige bzw. MSI-negative CRC-Tumore (B215 TU und B245 TU2). Die Paraffin-eingebetteten Tumoren wurden dem archivierten Material der Chirurgischen Universitätsklinik Heidelberg entnommen, bzw. durch das Institut für Pathologie Mannheim zur Verfügung gestellt. Genomische DNA der Tumor- und der entsprechenden durch Mikrodissektion mit Standardverfahren erhaltenen Mukosa-Proben wurden von Ch. Sutter zur Verfügung gestellt (Sutter et al., Mol. Cell Probes. 13 (1999), 157-165). Der MSI-Status wurde mittels des „NCI ICG-HNPCC“-Mikrosatellitenmarker-Panels (Boland et al., Cancer Res. 58 (1998), 5248-5257) sowie zusätzlich mittels Amplifikation der weiteren Mikrosatellitenmarker BAT40, ACTC, D13S153, D5S107 und D5S406 ermittelt.

(D) Genomische MSI-Analysen

Primer wurden mittels des im „HUSAR“-Programmpaket enthaltenen „PRIMER“-Programms entworfen und nach weiteren Bindungsstellen (Sequenzhomologen) zu anderen menschlichen Sequenzen durch eine „FASTA“-Analyse [HUSAR-Programmpaket]. überprüft. Die Primerpositionen wurden so ausgewählt, dass sie möglichst nahe an dem Repeat-Bereich lagen, um so ein kurzes Amplimer mit einer Länge von etwa 100 bp zu erhalten. Dies war für eine genaue Fragmentanalyse der von in Paraffin eingebetteten Gewebeproben erhaltenen DNA optimal. Außerdem erwies sich dies als für die Analyse von Kandidaten mit unbekannter genomischer Struktur notwendig. Alle verwendeten Primer sind in der nachstehenden Tabelle 1 aufgelistet.

PCR-Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 25 µl (50 ng genomische DNA, 2,5 µl 10 x Reaktionspuffer (Life Technologies, Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 0,25 µM von jedem Primer und 0,5 E Taq DNA-Polmyrase (Life Technologies)) durchgeführt. Ein Primer war am 5'-Ende Fluoreszein-markiert. Nach einem initialen Denaturierungsschritt bei 94°C (4 min.) wurden 35 Zyklen bei 94°C Denaturierungstemperatur für 30'', unterschiedlichen Anlagerungstemperaturen je nach Primersystem bei 57°-63°C für 45'' und 72°C Extensionstemperatur für 30'' durchgeführt, danach schloß sich ein letzter Elongationsschritt bei 72° (6 min.) an. PCR-Produkte wurden auf einem 2% Agarose-Gel analysiert. Vor der Fragment-Analyse wurden die Amplifikationsprodukte 1:2 bis 1:10 verdünnt und 1 µl des verdünnten Produkts wurden mit 5 µl Auftragspuffer (0,6% „blue dextran“, 100% Formamid) vermischt. Die Proben wurden 3 min. bei 90° denaturiert und anschließend wurden die Fragmente auf einem „ALF“-DNA-Sequenzierungsgerät (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) unter Verwendung von 6,6% Polyacrylamid/7 M Harnstoff-Gelen elektrophoretisch

13
aufgetrennt. Die Größe, Höhe und das Profil der
Mikrosatelliten-Peaks wurde mittels der „AlleleLinks“-Software
(Amersham Pharmacia Biotech) analysiert.

Tabelle 1

Gen	PCR Primer für genomische DNA		PCR Primer für cDNA	
MNRs	sense 5'-3'	antisense 5'-3'	sense 5'-3'	antisense 5'-3'
FLT3LG	GGG ATG ACG TGG TGG TG	GTG ATC CAG GGC TTC AGC	CCT ATC TCC TCC TGC TGC TG	GTG ATC CAG GGC TTC AGC
SYCP1	CCC CTT CAT CTC TAA CAA CCC	CAC TGA TTC TCT GAA ATT AAA CAA ATA AC	CAG TGA AGA CAC CAA CAA AAC C	CAC TGA TTC TCT GAA ATT AAA CAA ATA AC
SLC4A3	TGG AGT GGA TGA GGA AGA GG	CTT CTG TGG GGT CCC TGA G	TGG AGT GGA TGA GGA AGA GG	ATC TGT GGG CAC CTG CTG
aCl	CCA GAA GCA AAT TCA CAA GAC	TTT TGC GTG TTC CTT CCT TC	CCA GAA GCA AAT TCA CAA GAC	CAC CCT CTC TCT TCT CCA GTA TTC
PTHL3	TTT CAC TTT CAG TAC AGC ACT TCT G	GAA GTA ACA GGG GAC TCT TAA ATA ATG	GGA AAC TAA CAA GGT GGA GAC G	GAA GTA ACA GGG GAC TCT TAA ATA ATG
SLC23A1	GAC TAC TAC GCC TGT GCA CG	TGT TTA TTG CGT GGA TGG G	AAA GGA TGG ACT GCG TAC AAG	AAG GAC GAG CCC AAA GAA G
GART	AGT GTT GAA GAA TGG CTC CC	TGT TCC AGA TAT TAA GNC AGC CAC	GAA CAT CCC CAG AGT CCT CC	TGT TCC AGA TAT TAA GAC AGC CAC
MAC30X	TGT TGC GGA GCC CCT AC	AAC CAC CCT GTA GGC ATC TC	CCT GGT TTA AGT CCT TTC TGT TTT	AAC CAC CCT GTA GGC ATC TC
PRKDC	GAC TCA TGG ATG AAT TTA AAA TTG G	TTT GAA AAT AAC ATG TAA ATG CAT CTC	CAG CCC TGG ACC TTC TTA TTA A	GAC AAC CCC TTC AGA CAT CC
ATR	TCT TCT GTA GGA ACT TGA AAG CC	TGA AAG CAA GTT TTA CTG GAC TAG G	AGC TCC CAT GAA GTA ATC CG	TGA AAG CAA GTT TTA CTG GAC TAG G
MBD4	TGA CCA GTG AAG AAA ACA GCC	GTT TAT GAT GCC AGA AGT TTT TTG	TGA CCA GTG AAG AAA ACA GCC	GTG GTG GGG GGC TAA GAG
SEC63	AGT AAA GGA CCC AAG AAA ACT GC	TGC TTT TGT TTC TGT TGC TTT G	TGA AAA GGA GCA GTC CAT CTG	TGC TTT TGT TTC TGT TGC TTT G
OGT	TCA CTT TTG GCT GGT CAG AG	GGG AGG GAA AGG AGG TAA AG	TCA CTT TTG GCT GGT CAG AG	TGT CAA AAA TGC GTG CCT C
HPDMPK	GCT TGA TCC TGT TGA TTT TCT ACT C	CTG AAT GGA GAA GAA AGT GAG ATG	TCC TAC TGG ATG TGC TGC C	CTG AAT GGA GAA GAA AGT GAG ATG
U79260	TTT GTT ATA TCC CAT TAG GTG CC	AGC CTG GTG ACA GAG TGA GAC	CAT TAA GCA AAG CAG CCA GG	AGC CTG GTG ACA GAG TGA GAC
DNRs	sense 5'-3'	antisense 5'-3'	sense 5'-3'	antisense 5'-3'
KIAA0040	CAT CTC AAT ATG GTT CCC AAG TG	CTT GCC CAC GTA CCT CCT AC	CAA GAA GTA ACG TGG AAG GAG G	GTG CAT TAT TTC AGG GGT TCC

(E) Bestätigung der Sequenz

Alle kodierenden Mikrosatelliten wurden durch „Thermocycle“-Sequenzierung bestätigt. PCR-Reaktionen wurden wie vorstehend beschrieben durchgeführt. PCR-Produkte wurden mittels des „QIAquick“-PCR-Reinigungskits (Qiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt und mit den entsprechenden Primern unter Verwendung des „Big Dye terminator cycle sequencing kit (Perkin Elmer, Darmstadt, Deutschland) sequenziert.

(F) Expressionsanalysen und cDNA-MSI-Analysen

Poly(A)RNA von 14 Dickdarmkrebszelllinien wurde mittels des Oligo(dT)-Zellulose-Verfahrens (Vennstrom und Bishop, Cell 28 (1982), 135-143) extrahiert. Die Qualität der RNA-Präparation und der Reversen Transkription wurde mittels GAPDH-Amplifikation (Hsu et al., Int. J. Cancer, 55: 397-401, 1993) überprüft. Primerpaare, die eine Differenzierung nach Größe zwischen cDNA- und eventuell als Kontamination enthaltenen genomischen DNA-Amplimeren erlaubten, wurden für die Expressionsanalyse durch semi-quantitative RT-PCR als geeignet erachtet. Im Fall einer unbekannten Exonstruktur wurden Primer entworfen, die auf der cDNA lokalisiert waren und es wurde überprüft, ob genomische PCR entweder dasselbe Amplifikationsprodukt ergab wie die RT-PCR, ein längeres oder überhaupt keines. Alle verwendeten Primer sind in Tabelle 1 aufgeführt. 100 ng poly(A⁺)RNA wurden mittels 0,5 µg oligo(dT)₁₂₋₁₈ in einem Endvolumen von 20 µl mit 200 Einheiten M-MLV Reverser Transkriptase (SuperScript, Life Technologies) 1 Stunde bei 37°C revers transkribiert. Zur Überprüfung der RNA-Integrität und der Synthese des ersten cDNA-Strangs wurden Kontroll-PCR-Reaktionen mittels GAPDH-spezifischen Primern durchgeführt (Hsu et al., Int. J. Cancer 55 (1993), 397-401). PCR-Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl (1 µl cDNA, 5 µl 10 x Reaktionspuffer (Life Technologies), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 0,25 µM von jedem Primer und 0,5 Einheiten Taq DNA-Polymerase (Life Technologies) mittels des vorstehend für die Amplifikation

genomischer DNA beschriebenen Amplifikationsprotokolls durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf 2% Agarose-Gelen aufgetrennt und über Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht.

PCR-Reaktionen für cDNA-MSI-Analysen wurden wie für die Expressionsanalysen beschrieben durchgeführt, außer dass ein am 5'-Ende mit Fluoreszein markierter Primer verwendet wurde. Die Fragmentanalyse wurde wie für die genomische Analyse beschrieben durchgeführt.

Beispiel 2: Computergestützte Analysen

Die Computer-Datenbank-Sequenzanalyse ergab 365 Kandidaten für Mononukleotid-Repeats mit einer Minimallänge von 9 Basen (Gesamt: 17654 Mononukleotid-Repeats mit einer Länge von ≥ 6 Basen). Ferner wurden 2028 Dinukleotid-Repeats mit einer Minimallänge von 8 Basen gefunden. Der längste Mononukleotid-Bereich umfasste 32 Basen und der längste Dinukleotid-Bereich 42 Basen, d.h., 21 Repeat-Einheiten.

Beispiel 3: Identifizierung von cMNR

Hierfür wurden alle cMNR mit 10 oder mehr Repeat-Einheiten und alle C- oder G-Repeat-Bereiche mit 9 oder mehr Repeat-Einheiten analysiert, da davon ausgegangen wurde, dass in den längeren Repeat-Bereichen eine höhere Mutationrate vorlag. Außerdem wurden alle Kandidaten-Sequenzen, die weitere Ausschlusskriterien erfüllten, von einer Analyse ausgeschlossen. Somit wurden insgesamt 43 cMNR Kandidaten-Sequenzen erhalten, die 12 Duplikate umfaßten, wodurch 31 verschiedene Kandidaten-Sequenzen ausgewählt wurden.

Diese Kandidaten-Sequenzen mußten experimentell als Mikrosatelliten in kodierenden Bereichen verifiziert werden. Daher mußten die Repeat-Bereiche flankierende Primer für jede Kandidaten-Sequenz entworfen werden. Die vollständige Information über die genomische Struktur konnte mittels eines Sequenzvergleichs der cDNAs mit Datenbanken für die genomische

Sequenz erhalten werden. Der systematische Sequenzvergleich lieferte Informationen über Exon/Intron-Übergänge und kodierende Bereiche für 9 der 31 Kandidaten-Sequenzen.

Daher mußten für die restlichen 22 cDNA-Sequenzen ohne veröffentlichte genomische Struktur Primerpaare auf der Basis der cDNA-Sequenz entworfen werden. Die Amplifikation der Repeat-Bereiche sowohl in der cDNA als auch der entsprechenden genomischen DNA ergab identische PCR-Produkte in weiteren 9 der 22 Kandidaten, was zeigt, dass diese 9 Sequenzen den Mononukleotid-Bereich in einem kodierenden Bereich enthalten. Die PCR-Reaktion der genomischen DNA-Sequenzen verlief in 13 Mononukleotid-Bereichen negativ oder ergab längere Amplimere als über die Amplifikation der entsprechenden cDNA. Für jede dieser Kandidaten-Sequenzen war somit eine weitere Analyse der genomischen Struktur des entsprechenden Gens erforderlich. Insgesamt wurden 18 Mononukleotid-Bereiche einer Sequenzanalyse unterzogen.

Repeat-Bereiche konnten in 17 der 18 Fälle durch Sequenzanalysen bestätigt werden. Nur ein Kandidat zeigte nicht das erwartete A₁₄-Repeat. In zwei Kandidaten-Sequenzen lag der Repeat-Bereich innerhalb der vorhergesagten kodierenden Sequenz der genomischen DNA-Sequenzen, eine Expression konnte jedoch mittels RT-PCR-Analysen nicht nachgewiesen werden. Außerdem war keine Information hinsichtlich ESTs oder einer partiellen kodierenden Sequenz identifizierbar, die zu dem Repeat-Bereich homolog war. Diese Untersuchungen wurden mittels der „EST Clustering software“ durchgeführt (Husar-Programmpacket). Somit lieferte die Sequenzanalyse zusammen mit den bestätigenden Experimenten die Basis für die Identifizierung von 15 cMNR (vgl. Fig. 1).

Beispiel 4: Nachweis von cDNR

Für die cDNR wurden die gleichen Strategien für die Sequenzanalyse und die experimentelle Bestätigung der Sequenz-

daten angewandt, wobei mit den längsten cDNR-Kandidaten begonnen wurde. Nach Identifizierung von cDNA-Sequenzen von 4 cDNR-Kandidaten wurde der MSI-Status in MSI+ und MSI-Dickdarmkrebszelllinien und MSI+ Tumoren analysiert. Einer dieser Kandidaten ((AC)₇) zeigte eine Mutation in einem MSI+ Tumor, jedoch keine Mutation in den nicht-MSI+ (Tumor)zellen (vgl. Fig. 2). Es wird davon ausgegangen, dass bei cDNR, deren Repeat-Anzahl höher als 9 ist, die Mutationsrate erhöht ist.

Beispiel 5: Untersuchungen zu Mutationsraten der cMNR

Im einzelnen wurden variierende Mutationsraten im Bereich von 40 bis 80% in den drei C₉-cMNR beobachtet und von 10 bis 100% in den A₁₀-cMNR, während die T₁₀- und N₂₁₁-cMNR konstant höhere Mutationsraten zwischen 75 und 100% zeigten. Bei drei cMNR-Markern ((SYCP1 (A10), ATR (A10), und MBD4 (A10)) konnten in MSI+ - Zelllinien und Tumorproben nur geringe Mutationsfrequenzen nachgewiesen werden. In MSI+ Zelllinien und MSI+ Tumoren wurden jedoch für die beiden cMNR-Marker (HPDMPK (T14) und U79260 (T14)) hohe Mutationsraten nachgewiesen: Alle 5 MSI+ Zelllinien und 10 von 11 MSI+ Tumoren zeigten eine Sequenzänderung hinsichtlich HPDMPK. Analoge Ergebnisse wurden für die Mono-cMNR im U79260-Gen gefunden, das in allen 5 MSI+ Zelllinien und 9 von 11 MSI+ Tumoren mutiert war (vgl. nachstehende Tabelle 2).

Tabelle 2: Frequenz von Mutationen in cMNR in MSI+
Tumorzelllinien und MSI+ Tumoren.

Gen	Repeat	LoVo	KM12	HCT116	LS174T	SW48	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	1
FLT3LG	C ₉	•	•	o	o	•	o	o	•	•	o	•	•	o	o		
SYCP1	A ₁₀	•	o	o	o	o	•	o	o	o	•	o	o	o	o	o	
SLC4A3	C ₉	o	•	o	•	o	o	o	•	o	O	o	o	o	o	•	
aC1	T ₁₀	•	o	o	•	•	•	•	•	•	O	•	•	o	o	•	
PTHL3	A ₁₁	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	o	•	•	•	•	
SLC23A1	C ₉	o	•	•	•	•	•	•	o	o	•	o	•	•	•	o	
GART	A ₁₀	o	•	o	o	•	o	•	o	o	O	o	o	•	•	o	
MAC30X	A ₁₀	o	o	•	o	o	o	•	o	o	O	o	•	o	o	o	
PRKDC	A ₁₀	o	•	o	o	o	•	•	o	o	O	o	o	•	•	o	
ATR	A ₁₀	o	o	o	o	o	•	o	o	o		o	o	o	o	•	
MBD4	A ₁₀	o	o	•	o	o	o	o	o	o	O	o	o	o	o	o	
SEC63	A ₁₀	•	•	•	•	•	o	•	•	•	•	o	•	•	•	•	
OGT	T ₁₀	•	•	o	•	o	o	o	o	•	•	o	•	•	•	o	
HPDMPK	T ₁₄	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	o	•	•	•	•	
U79260	T ₁₄	•	•	•	•	•	•	o	•	•	•	o	•	•	•	•	

o Mutation nicht vorhanden, • Mutation vorhanden.

Beispiel 6: Expressionsanalysen von cMNR

Die Expressionsspiegel der vorstehenden 15 cMNR enthaltenden Gene unterschieden sich stark und schwankten zwischen nicht nachweisbarer Expression und konstant starker Transkriptionsaktivität in allen 14 getesteten Dickdarmkrebszelllinien. Das an der Meiose beteiligte SYCP1-Gen und das für den hämatopoetischen Wachstumsfaktor FLT3LG kodierende Gen wurden in Dickdarmkrebszelllinien nicht exprimiert. Das Gen HPDMPK, das stromabwärts des Genlocus für zwei mit myotonischer Dystrophie (Dystrophia myotonica) assoziierter Gene liegt und für ein hypothetisches Protein kodiert und das für das ER-Membranprotein SEC63 kodierende Gen wurden in allen Zelllinien

nicht sehr stark, jedoch konstant exprimiert. Die aC1-mRNA und die Splice-Variante 3 des PTHrP-Gens (PTHrP3) wurden in Dickdarmkrebszelllinien in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert. Beide Gene wurden in etwa 50% der untersuchten Zelllinien exprimiert. Das für die trifunktionelle Ribonukleotidsynthetase kodierende Gen GART, das für die DNA-abhängige Proteinkinase kodierende Gen PRKDC und das mit dem Zellzyklus in Zusammenhang stehende Gen ATR wurden in Dickdarmzelllinien hoch-exprimiert. Auch wird MAC30X in Dickdarmkrebszelllinien hoch exprimiert (vgl. Fig. 3). Zusammengefaßt kann jedoch festgestellt werden, dass die Expressionsspiegel der betreffenden Gene mit dem MSI-Status der betroffenen Zelllinien nicht korrelieren.

Beispiel 7: MSI-Analyse von cDNAs

Es wurde eine Fragmentanalyse amplifizierter cDNAs der vorstehenden cMNR von 14 Dickdarmkrebszelllinien durchgeführt: Drei cMNR zeigten die Wildtyp-cDNA in betroffenen Zelllinien (GART) oder in den meisten betroffenen Zelllinien (SEC63). Bei sieben cMNR herrschte Übereinstimmung zwischen den genomischen und transkribierten Sequenzen (MAC30X, HPDMPK, U79260, MBD4 und ATR).

Beispiel 8: Stimulierung von CD8⁺-T Zellen gegen ein vorstehendes Genprodukt und Lyse von dieses Genprodukt exprimierenden MSI⁺-Tumorzellen.

(a) Stimulierung von CD8⁺-T-Zellen gegen ein erfindungsgemäßes Neo-Peptid.

Periphere Blutlymphozyten (PBL) wurden von einem HLA-A0201 positiven gesunden Probanden durch Dichtezentrifugation über einen Ficoll Paque®-Gradienten aufgereinigt. T-Lymphozyten wurden durch Abtrennung der B-Lymphozyten bzw. der Monozyten mit Hilfe Antikörper gekoppelter Magnetobeads (CD11, CD16, CD19, CD36 und CD56) (Pan T-cell isolation Kit®, Milteny, Bergisch Gladbach, Germany) gewonnen. Aus 30 ml Blut wurden

etwa 2×10^7 T-Zellen gewonnen. Von diesen wurden etwa 2×10^6 T-Zellen mit autologen über CD40 aktivierten B-Zellen (etwa 5×10^5), die mit einem der HLA-A0201 restringierten Neo-Peptide der nachstehenden Tabelle 3 (vgl. auch Fig. 2) beladen worden waren, stimuliert, d.h. in 24 Lochplatten kokultiviert. Diese Stimulierung wurde fünf bis sechs Wochen lang wöchentlich wiederholt.

Tabelle 3: Beispiele von HLA-A0201 restringierten Neo-Peptiden, die durch mutierte cMNR kodiert sind.

Peptid-Gen	Peptidlänge	AS-Sequenz des identifizierten Neo-Peptids
#15 HPDMPK	9mer	FLSASHFLL
#16 OGT	10mer	SLYKFSPFPL
#21 U79260	9mer	TLSPGWSAV

Mittels bekannter IFN-gamma ELISpotanalyse wurde die Reaktivität gegenüber den Neo-Peptiden, beginnend an Tag 0, wöchentlich bestimmt. Am Tag 28 wurde eine Reaktivität von 1760 spezifische Zellen / 1000000 Zellen gegen das Peptid #16 (SLYKFSPFPL), am Tag 35 von 1123 spezifische Zellen / 1000000 Zellen gegen das Peptid #15 (FLSASHFLL) und von 733 spezifische Zellen / 1000000 Zellen gegen das Peptid #21 (TLSPGWSAV) beobachtet. Die Stärke der Reaktion lag somit in Bereichen, die man normalerweise nur mit viralen Antigenen erreicht, der Wert für das Peptid GILGFVFTL, welches von einem Matrixprotein des Influenzavirus abgeleitet war, lag am Tag 35 bei 1170 spezifische Zellen / 1000000 Zellen. Somit wird deutlich, dass gegen die erfindungsgemäßen Neo-Peptide aktivierte CD8⁺-T-Zellen stimuliert werden können.

(b) Lyse von Zellen, die mit erfindungsgemäßen Neo-Peptiden beladen wurden

Nach einer weiteren Restimulierung wurde das zytotoxische

Potential der aktivierten CD8⁺-T-Zellen gegen die mit den Neo-Peptiden beladenen HLA-A2.1⁺ Colonicarcinomzelllinien SW 480 und HCT 116, sowie T2-Zellen getestet. Als Kontrolle dienten unbeladene Zellen. Jeweils 1×10^6 Zellen wurden mit ⁵¹Cr (100µCi) für 1h bei 37°C radioaktiv markiert und mit steigenden Mengen an aktivierten CD8⁺-T-Zellen für 4h kokultiviert. Durch die Messung der freigesetzten Radioaktivität im Überstand wurde die spezifische Lyse der jeweiligen Zelllinie bestimmt. Es zeigte sich, dass die HLA-A0201 exprimierenden Zelllinien lysiert werden können, wenn sie mit Neo-Peptiden beladen sind, unbeladene Zellen werden nicht lysiert.

Ferner wurden Kompetitions-Experimente durchgeführt. Durch Zugabe von einem Überschuss (50 „kalte“ zu 1 „heissen“ Neo-Peptid beladenen Zelle) Neo-Peptid beladener, jedoch nicht radioaktiv markierter T2-Zellen zu einem Reaktionsansatz mit radioaktiv markierten, Neo-Peptid beladenen T2-Zellen und aktivierten CD8⁺-T-Zellen konnte die Freisetzung von Radioaktivität und damit die spezifische cytotoxische Aktivität der T-Zellen kompetiert werden. Somit wird deutlich, dass die gegen die Neo-Peptide gerichteten CD8⁺-T-Zellen spezifisch die Neo-Peptide exprimierenden Tumorzellen erkennen und lysieren.

Patentansprüche

1. Gene mit kodierenden Mononukleotid-Mikrosatelliten (cMNR) oder Dinukleotid-Mikrosatelliten (cDNR), wobei die Gene aus MSI+ -Tumorzellen isolierbar sind und sich von den entsprechenden Genen aus nicht-MSI+(Tumor)zellen durch Mutationen in den cMNR oder cDNR unterscheiden und für Neo-Peptide umfassende Genprodukte kodieren.
2. Gene nach Anspruch 1, wobei die entsprechenden Gene aus nicht-MSI+(Tumor)zellen jene von Fig. 1 sind.
3. Gene nach Anspruch 1 oder 2, wobei die aus MSI+- Tumorzellen isolierbaren Gene die in Fig. 2 angegebenen Mutationen aufweisen.
4. Genprodukte, kodiert durch die aus MSI+- Tumorzellen isolierbaren Gene nach einem der Ansprüche 1-3.
5. Antikörper, gerichtet gegen die Genprodukte nach Anspruch 4.
6. Verfahren zur Identifizierung von aus MSI+-Tumorzellen isolierbaren Genen mit cMNR oder cDNR nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei dem man in Datenbanken von nicht-MSI+(Tumor)zellen nach cMNR oder cDNR enthaltenden Gen-Sequenzen sucht, diese zur Auffindung gleicher Gene in MSI+ -Tumorzellen verwendet und letztere Gene dahingehend selektioniert, daß sie gegenüber den Gen-Sequenzen aus den nicht-MSI+(Tumor)zellen Mutationen in den cMNR oder cDNR aufweisen und für Neo-Peptide umfassende Genprodukte kodieren.
7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei zur Auffindung der gleichen Gene in MSI+ -Tumorzellen eine PCR-Reaktion mit Primern durchgeführt wird, die aus den cMNR oder cDNR umfassenden Gen-Sequenzen entwickelt sind.

8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, wobei die Primer jene von Tabelle 1 sind.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6-8, wobei auf solche Gene aus den MSI+ -Tumorzellen selektioniert wird, die in MSI+ -Tumorzellen verschiedener MSI+ -Tumoren gleichen Typs mit einer Häufigkeit von 1 % - 100 % vorliegen.

10. Kit, umfassend einen oder mehrere Vertreter eines Gens nach einem der Ansprüche 1 bis 3, eines Genprodukts nach Anspruch 4, eines Antikörpers nach Anspruch 5 und/oder eines Primerpaares von Tabelle 1.

11. Verwendung der Gene nach einem der Ansprüche 1 bis 3, der Genprodukte nach Anspruch 4, der Antikörper nach Anspruch 5 oder der Kits nach Anspruch 10 zur molekularen Untersuchung von MSI+ -Tumoren und ihren Vorstufen sowie zu deren Diagnose.

12. Verwendung der Gene in exprimierbarer Form nach einem der Ansprüche 1-3 oder der Genprodukte nach Anspruch 4 zur Immunisierung eines Individuums gegen MSI+ -Tumore und ihre Vorstufen.

13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei die Immunisierung im Rahmen einer prophylaktischen und/oder therapeutischen Behandlung von MSI+-Tumoren erfolgt.

Figur 1

Gen	Acc. no.	Chr.
MNRs		
FLT3LG	U29874	19q13.3
SYCP1	X95654	1p13-12
SLC4A3	U05596	2q36
aC1	D82070	4
PTHL3	M24350	12p12-11
SLC23A1	AF058319	20p13
GART	X54199	21q22.1
MAC30X	L19183	17
PRKDC	U63630	8Q11
ATR	U76308	3q22-24
MBD4	AF072250	3q21-24
SEC63	AF100141	6q16-22
OGT	U77413	X?
HPDMPK	Y10936	19q13.3
U79260	U79260	16
DNRs		
KIAA0040	D25539	1q24-25

Bezeichnung	Beschreibung Nukleotid-/ Peptidsequenz	Repeat
<u>CMNRs:</u>		
SLC4A3	wt	C ₉
	+1	...CTGAGGCAGAACCTGTGGAGCCCCCCCCCTCAGGGACCCACAGAAGGC...
	neo	...CTGAGGCAGAACCTGTGGAGCCCCCCCCCTCAGGGACCCACAGAAGGC... ...EAEPVEPPPLRDPTEGKVLHWK
FTL3LG	wt	C ₉
	-1	...TCTCCCTCCCTGCTCCAGCCCCCCCCAGCTGTCTTCGCTTCGTCCA...
	neo	...TCTCCCTCCCTGCTCCAGCCCCCCCCAGCTGTCTTCGCTTCGTCCA... ...VTKCAFQPPPAVFASSRPTSPASCRPPSSWWR
SLC23A1	wt	C ₉
	-1	...CACGGCTGTCCTGTGCCCCACCCCCCCCCCATCCACGCAATAAACAGGG...
	neo	...CACGGCTGTCCTGTGCCCCACCCCCCCCCCATCCACGCAATAAACAGGG... ...ARLSCAPPPPSIQ
	+1	...CACGGCTGTCCTGTGCCCCACCCCCCCCCCATCCACGCAATAAACAGGG...
	neo	...ARLSCAPPPPHPRNKQGNFRGPLLCIS
GART	wt	A ₁₀
	-1	...GACAAATCATTTCTCTTTTGAAAAAAGGCCAGAGTGGCTGTCTTA...
	neo	...GACAAATCATTTCTCTTTTGAAAAAAGGCCAGAGTGGCTGTCTTA... ...LTNHSFEKKRPEWLS

SEC63

		A ₁₀
wt	...	TCAAAAAAAAAAGAACCTTTTAAAAAAACCTACACCTGTGCTATTAC...
-1	...	TCAAAAAAAAAAGAACCTTTTAAAAAAACCTACACCTGTGCTATTAC...
neo	...	KSKKKKPLKKNLHLCYHQSQRNKRQMESLGMLQ

aC1

		T ₁₀
wt	...	AAAGAACCAATTTTACAAATTTTTCCTGTGTCAGTTGAATTGGG...
-1	...	AAAGAACCAATTTTACAAATTTTTCCTGTGTCAGTTGAATTGGG...
neo	...	SKNQFTIFFSCQLNLGRKEHAKIFTFQFOLDTMDGNPGELTLEQLQIKOSONALLPAGPLTQTPV

OGT

		T ₁₀
wt	...	TTCCCCCCTCCCCCAATCTTTTTCCTTCCCTTACAAATTTCCCC...
-1	...	TTCCCCCCTCCCCCAATCTTTTTCCTTCCCTTACAAATTTCCCC...
neo	...	SSPPPPNLFSLYKFSPPFLPPFPPIREH

PTH3

		A ₁₁
wt	...	CAGCACTTCTGTGGGTTTGAAAAAAGGAAACACAGAAAGAAC...
-1	...	CAGCACTTCTGTGGGTTTGAAAAAAGGAAACACAGAAAGAAC...
neo	...	TALLWGLKKRKTTEEHIICN

HPDMPK

		T ₁₄
wt	...	TGGACCTCTGAGAGGGTGTITTTTTTTTATCAGCATCTCACTT...
-1/-4	...	TGGACCTCTGAGAGGGTGTITTTTTTTTATCAGCATCTCACTT...
neo	...	AVDPLRRVFFF ₂ ISISLSSPSPNPLPAMLSTPRTHQOQADGS
-2/-5	...	TGGACCTCTGAGAGGGTGTITTTTTTTTATCAGCATCTCACTT...
neo	...	AVDPLRRVFFF ₂ LSASHFLHSAPTPSLPCFPPOGPTSRQTAANFGTI
-3	...	TGGACCTCTGAGAGGGTGTITTTTTTTTATCAGCATCTCACTT...
verklirzt	...	AVDPLRRVFFFYQHLTFFSIQPPPPCHAFHPKDPAGSRRQLLVPLKGPPIAPILS...

T₁₄

...GCATTTCTTTTCTTTCTTTTCTTTTCTTTTGTGAGACACAGTCTCAC...
...GCATTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTGTGAGACACAGTCTCAC...
...HFLFSLFFFLRHSLTSPGWSAVARSRLTATSASQVQVILLQPPEWGLQARAAAPS
...GCATTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTGTGAGACACAGTCTCAC...
...HFLFSLFFF

(AC)₇
 ...GTGTGTCACATGCACGTAACACACACACACAAATTCAGGTAGCAG...
 ...GTGTGTCACATGCACGTAACACACACACACACAAATTCAGGTAGCAG...
 ...VHMHVTHHTQIQVAGTWA^SIFCSSNGHWLCTLCRE^VHYLQSQKCLMGK...
 ...PCQIQTHIYNFLTSKAPIHHLFHKPLRLQMHAFLFLTLHNFYWKYS

Figur 3

Gene	Repeat	SW480	Colo320	HT29	Caco 2	SW707	LS180	SW948	CXFP4	CX-2	SW48	LS174T	HCT116	KM12	LoVo
FLT3LG	Ligand der Fms-verwandten Tyrosin-Kinase 3	C ₉													
SYCP1	Synaptonemaler Komplex-Protein 1	A ₁₀													
SLC4A3	Anionenaustauscher 3 Gehirn-Isoform	C ₉													
AC1	differentiell exprimiert in Neuroblastomen	T ₁₀													
PTHL3	Parathormon-ähnliches Protein, Spleißvariante 3	A ₁₁													
SLC23A1	Gelöstes Transportmolekül, Familie 23, Mitglied 1	C ₉													
GART	trifunktionelle Ribonukleotid-Transferase/-Synthetase	A ₁₀													
MAC30X	differentiell exprimiert in Meningeomen	A ₁₀													
PRKDC	Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase	A ₁₀													
ATR	Ataxia teleangiectasia und Rad3-verwandt	A ₁₀													
MBD4	Methyl-CpG-Bindungsdomänen Protein 4	A ₁₀													
SEC63	Endoplasmatisches Retikulum, Membran Protein	A ₁₀													
OGT	O-glykosidische N-Acetylglucosamin-Transferase	T ₁₀													
HPDMPK	hypothet. Protein3 des DMPK-/DMAHP-Genlokus	T ₁₄													
U79260	Klon 23745-mRNA	T ₁₄													
KIAA0040	humane mRNA des KIAA0040-Gens	(AC) ₇													
GAPDH															



BERICHTIGTE FASSUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
17. Januar 2002 (17.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/004664 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68**

(74) Anwalt: **HUBER, Bernard**; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, 81825 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/02510

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:
4. Juli 2001 (04.07.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 32 608.0 7. Juli 2000 (07.07.2000) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: **KNEBEL DOEBERITZ, von, Magnus** [DE/DE]; Chirurgische Universitätsklinik, Sektion Molekulare Diagnostik und Therapie, Im Neuenheimer Feld 110, 69120 Heidelberg (DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **BORK, Peer** [DE/DE]; Maxerhofstr. 1, 69118 Heidelberg (DE). **YUAN, Yan, Ping** [DE/DE]; Mayerhofstr. 1, 69118 Heidelberg (DE). **GEBERT, Johannes** [DE/DE]; Chirurgische Universitätsklinik, Im Neuenheimer Feld 110, 69120 Heidelberg (DE). **WÖRNER, Stefan** [DE/DE]; Chirurgische Universitätsklinik, Im Neuenheimer Feld 110, 69120 Heidelberg (DE). **LINNEBACHER, Michael** [DE/DE]; Chirurgische Universitätsklinik, Im Neuenheimer Feld 110, 69120 Heidelberg (DE).

(48) Datum der Veröffentlichung dieser berichtigten Fassung: 19. September 2002

(15) Informationen zur Berichtigung:
siehe PCT Gazette Nr. 38/2002 vom 19. September 2002, Section II

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: GENES AND THEIR GENETIC PRODUCTS PERTINENT TO MICROSATELLITE INSTABLE (MSI+) TUMOURS

WO 02/004664 A2

(54) Bezeichnung: FÜR MIKROSATELLITENINSTABILE (MSI+)-TUMORE RELEVANTE GENE UND IHRE GENPRODUKTE

(57) Abstract: The invention relates to genes comprising coding mononucleotide microsatellites (cMNR) or dinucleotide microsatellites (cDNR). The genes can be isolated from MSI+ tumour cells. Said genes differ from corresponding genes from non-MSI+ (tumour) cells by mutations in the cMNR or cDNR and code for gene products including neopeptides. The invention also relates to the use of the genes and their gene products for the prevention, diagnosis and/or therapy of MSI+ tumours.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Gene mit kodierenden Mononukleotid-Mikrosatelliten (cMNR) oder Dinukleotid-Mikrosatelliten (cDNR), wobei die Gene aus MSI+ -Tumorzellen isolierbar sind und sich von den entsprechenden Genen aus nicht-MSI+ (Tumor)zellen durch Mutationen in den cMNR oder cDNR unterscheiden und für Neo-Peptide umfassende Genprodukte kodieren. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der Gene bzw. deren Genprodukte zur Prävention, Diagnose und/Therapie von MSI+ -Tumoren.

**Für mikrosatelliteninstabile (MSI+)-Tumore
relevante Gene und ihre Genprodukte**

Die vorliegende Erfindung betrifft Gene, die für MSI+ -Tumore relevant sind, und ihre Genprodukte. Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung solcher Gene und die Verwendung der Gene bzw. deren Genprodukte zur Prävention, Diagnose und/oder Therapie von MSI+ -Tumoren.

Tumorzellen akkumulieren Instabilitäten (Mutationen) in Genen, die für die Aufrechterhaltung eines normalen Wachstums und einer normalen Differenzierung essentiell sind. In menschlichen Tumoren wurden zwei Arten genetischer Instabilität identifiziert: Chromosomale Instabilität (CIN) und Mikrosatelliten-Instabilität (MSI), wobei letztere durch Längenvariationen repetitiver DNA-Sequenzen in diploiden Tumorzellen gekennzeichnet ist. Der Typ und das Spektrum mutierter Gene unterscheidet sich stark zwischen CIN- und MSI+ -Tumoren, was auf verschiedene, jedoch sich nicht gegenseitig ausschließende Wege der Krebsentstehung hindeutet. MSI tritt in etwa 90% von erblichen nicht-polypösen-kolorektalen Tumoren (HNPCC) auf sowie in etwa 15% von sporadischen Tumoren des Dickdarms und weiterer Organe und wird durch eine Mutations-bedingte Inaktivierung unterschiedlicher DNA-Mismatchreparatur-Gene hervorgerufen. MSI+ -Tumore weisen besondere histopathologische Merkmale auf. Auch werden MSI+ -Tumore einer Klassifizierung unterworfen, für die in der Regel Mikrosatelliten in nicht-kodierenden Bereichen oder Intronsequenzen herangezogen werden. Hinweise existieren allerdings, daß auch Mikrosatelliten in kodierenden Genbereichen einer Instabilität unterliegen. Dies könnte eine große Bedeutung für die Tumorgenese von MSI+ -Tumo-

ren haben.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit das technische Problem zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem MSI+ -Tumore auf molekularer Ebene untersucht werden können und das sich gegebenenfalls zur Diagnose und/oder Therapie von MSI+ -Tumoren eignet.

Erfindungsgemäß wird dieses technische Problem durch die Gegenstände in den Patentansprüchen gelöst.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis des Anmelders, daß in MSI+ -Tumoren kodierende Mononukleotid-Mikrosatelliten (cMNR) enthaltende Gene vielfach in ihren cMNR Instabilitäten (Mutationen) aufweisen. Hierzu hat er mittels einer Computer-Algorithmus-gestützten Datenbankanalyse ca. 17000 kodierende Mononukleotid-Mikrosatelliten (cMNR) und ca. 2000 kodierende Dinukleotid-Mikrosatelliten (cDNR) identifiziert, die aus Repeat-Einheiten mit $n \geq 6$ bzw. $n \geq 4$ bestehen. Die genetische Instabilität von 15 cMNR ($n \geq 9$) und 4 cDNR ($n \geq 5$) und die Expression der entsprechenden Gene wurden in 16 MSI+ - und 20 nicht-MSI+ Tumoren und Zelllinien untersucht, wobei bei diesen Analysen eine Fokussierung auf lange Repeateinheiten erfolgte. Die cMNR bzw. cDNR zeigten Instabilitäts(Mutations)häufigkeiten, die in MSI+ - Tumorzellen von 1 - 100% reichten, in nicht-MSI+(Tumor)zellen waren die cMNR bzw. cDNR jedoch stabil. Die meisten cMNR enthaltenden Gene (10 von 15 = 66%) wurden in allen MSI+ - und nicht-MSI+(Tumor)zellen hoch exprimiert, wobei keine signifikante Korrelation zwischen dem Expressionsspiegel und der Mutationshäufigkeit beobachtet werden konnte. Darüber hinaus hat er gefunden, daß die instabilen cMNR bzw. cDNR tragenden Gene für Neo-Peptide umfassende Genprodukte kodieren und daß sich diese Genprodukte zur Immunisierung eines Individuums gegen MSI+ -Tumore bzw. ihre Vorstufen eignen. Es wird auf die Figuren 1-3, Tabellen 1-3 und die nachstehenden Beispiele verwiesen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit Gene mit kodierenden Mononukleotid-Mikrosatelliten (cMNR) oder Dinukleotid-Mikrosatelliten (cDNR), wobei die Gene aus MSI+ - Tumorzellen isolierbar sind und sich von den entsprechenden Genen aus nicht-MSI+(Tumor)zellen durch Mutationen in den cMNR oder cDNR unterscheiden und für Neo-Peptide umfassende Genprodukte kodieren.

Der Ausdruck "kodierende Mononukleotid-Mikrosatelliten" umfaßt Repeat-Einheiten von mindestens drei gleichen Mononukleotiden A, T, G oder C ($n \geq 3$), wobei die Repeat-Einheiten in kodierenden Gen-Bereichen vorliegen.

Der Ausdruck "kodierende Dinukleotid-Mikrosatelliten" umfaßt Repeat-Einheiten von mindestens drei gleichen Dinukleotiden (AC, AG, AT, CA, CG, CT, GA, GC, GT, TA, TC, TG, $n \geq 3$), vorzugsweise von mindestens sechs ($n \geq 6$) und ganz besonders bevorzugt von mindestens neun ($n \geq 9$), wobei die Repeat-Einheiten in kodierenden Gen-Bereichen liegen.

Der Ausdruck "Gene mit mutierten cMNR oder cDNR", die aus MSI+ -Tumorzellen isolierbar sind, umfaßt solche Gene in vollständiger Länge, wie auch die Mutationen und die für die Neo-Peptide kodierenden Sequenzen enthaltende Teile davon.

Der Ausdruck "MSI+ -Tumorzellen" umfaßt jegliche Tumorzellen, die eine Mikrosatelliten-Instabilität aufweisen. Solche Tumorzellen können in jeglicher Form, z.B. in einem Verband von Zellen, insbesondere in einem Tumor, oder als solche in Kultur gehalten, vorliegen. Bevorzugte MSI+ - Tumorzellen umfassen die Zelllinien LoVo, KM12, HCT116, LS174 und SW48.

Der Ausdruck "nicht-MSI+(Tumor)zellen" umfaßt jegliche Zellen, die keine Mikrosatelliten-Instabilität aufweisen. Solche Zellen können jeglicher Art und Abstammung sein, z.B. können die Zellen von gesunden Individuen oder aus Tumoren stammen, bzw.

Tumor-Zelllinien sein.

Die Ausdrücke "Mutationen" und "Neo-Peptide umfassende Genprodukte" weisen darauf hin, daß in den kodierenden Mikrosatelliten (cMNR oder cDNR) von aus MSI+ -Tumorzellen isolierbaren Genen Mutationen im Vergleich zu den cMNR oder cDNR der entsprechenden Gene aus nicht-MSI+(Tumor)zellen vorliegen, wobei die Mutationen derart sind, daß die Gene für Neo-Peptide umfassende Genprodukte kodieren. Beispielsweise stellen sich die Mutationen als Insertionen und/oder Deletionen von einem oder mehreren Mono- bzw. Dinukleotiden dar. Die Mutationen führen zu Leserahmenverschiebungen derart, daß die Genprodukte in Form von Neo-Peptide, d.h. neugenerierte Peptide, umfassenden Genprodukten vorliegen.

In bevorzugter Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Gene solche, die sich von den in Fig. 1 angegebenen Genen aus nicht-MSI+(Tumor)zellen durch Mutationen in den cMNR oder cDNR unterscheiden und für Neo-Peptide umfassende Genprodukte kodieren. Ganz besonders weisen die erfindungsgemäßen Gene die in Fig. 2 angegebenen Mutationen in den cMNR oder cDNR auf und kodieren für die angegebenen Neo-Peptide umfassenden Genprodukte.

Erfindungsgemäße Gene können durch verschiedene Verfahren identifiziert und bereitgestellt werden. Günstig ist ein Verfahren, bei dem man in Datenbanken von nicht-MSI+(Tumor)zellen nach kodierende Mononukleotid-Mikrosatelliten (cMNR) oder Dinukleotid-Mikrosatelliten (cDNR) enthaltenden Gen-Sequenzen sucht, diese zur Auffindung gleicher Gene in MSI+ -Tumorzellen verwendet und letztere Gene dahingehend selektioniert, daß sie gegenüber den Gen-Sequenzen aus den nicht-MSI+(Tumor)zellen Mutationen in den cMNR oder cDNR aufweisen und für Neo-Peptide umfassende Genprodukte kodieren. Von Vorteil ist es, wenn zur Auffindung der Gene in den MSI+ - Tumorzellen DNA dieser einer PCR-Reaktion mit Primern unterzogen wird, die aus den cMNR oder

cDNR umfassenden Gen-Sequenzen entwickelt sind. Vorzugsweise umfassen die Primer die in Tabelle 1 angegebenen Sequenzen. Ferner ist es günstig, hinsichtlich der Selektion der Gene aus den MSI+ -Tumorzellen auf solche zu selektionieren, die in MSI+ -Tumorzellen von verschiedenen MSI+ -Tumoren gleichen Typs mit einer Häufigkeit von ca. 1 % - 100% vorliegen. Des weiteren ist es vorteilhaft zur Isolierung der Gene aus den MSI+ -Tumorzellen die entsprechenden Gen-Sequenzen aus der Datenbank zur Erstellung geeigneter Primer zu verwenden und mit diesen die Gene in den MSI+ -Tumorzellen zu amplifizieren. Eine Klonierung der amplifizierten Gene und ihre Expressionen können dann durch übliche Verfahren erfolgen. Als Vektoren zur Expression in E.coli sind z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8 zu nennen. Ferner sind für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4 sowie für die Expression in Insektenzellen z.B. der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A, anzuführen. Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um die in den Expressionsvektoren vorliegenden Gene zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli Stämme HB101, DH 1, x1776, JM101, JM109, BL21 und SG13009, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae* und die tierischen Zellen L, NIH 3T3, FM3A, CHO, C05, VERO und HeLa sowie die Insektenzellen sfg. Des weiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. transfizierte Zellen zu kultivieren und die exprimierten Genprodukte zu isolieren und zu reinigen. Ergänzend wird auf Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY (1989) verwiesen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Genprodukte, die durch die vorstehenden Gene kodiert sind. Es wird auf die vorstehenden Ausführungen hinsichtlich der erfindungsgemäßen Gene verwiesen. Diese Ausführungen gelten entsprechend für die erfindungsgemäßen Genprodukte. Insbesondere handelt es sich um solche Genprodukte, die sich durch Mutationen in den durch die cMNR oder cDNR kodierten Bereiche

von jenen Genprodukten der in Fig. 1 angegebenen Gene unterscheiden und Neo-Peptide umfassen. Ganz besonders umfassen die Genprodukte die durch die in Fig. 2 angegebenen cMNR oder cDNR bedingten Mutationen und weisen die angegebenen Neo-Peptide auf. Zur Bereitstellung der vorstehenden Genprodukte können übliche Verfahren verwendet werden. Es wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Auch kann es günstig sein, die Neo-Peptide als solche, insbesondere mittels Peptidsynthese bereitzustellen. Ergänzend wird auf Sambrook et al., supra verwiesen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Antikörper, die gegen die vorstehenden Genprodukte gerichtet sind. Es wird auf die vorstehenden Ausführungen hinsichtlich der Genprodukte verwiesen. Diese Ausführungen gelten entsprechend für die erfindungsgemäßen Antikörper. Vorzugsweise handelt es sich bei diesen Antikörpern um monoklonale, polyklonale oder synthetische Antikörper oder Fragmente davon. In diesem Zusammenhang bedeutet der Begriff „Fragment“ alle Teile des monoklonalen Antikörpers (z.B. Fab-, Fv- oder „single chain Fv“-Fragmente), welche die gleiche Epitopspezifität wie der vollständige Antikörper aufweisen. Die Herstellung solcher Fragmente ist dem Fachmann bekannt. Vorzugsweise handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Antikörpern um monoklonale Antikörper. Die erfindungsgemäßen Antikörper können gemäß Standardverfahren hergestellt werden, wobei vorzugsweise die vorstehenden Genprodukte als Immunogen dienen. Verfahren zur Gewinnung monoklonaler Antikörper sind dem Fachmann bekannt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Kits, die sich zur Untersuchung auf molekularer Ebene von MSI+-Tumoren sowie zu deren Diagnose eignen. Ferner eignen sich die Kits zur Identifizierung von für MSI+-Tumore relevanten Genen. Solche Kits umfassen einen oder mehrere Vertreter eines erfindungsgemäßen Gens, Genprodukts, Antikörpers und/oder Primerpaares. Es wird auf die vorstehenden Ausführungen hinsichtlich

erfindungsgemäßer Gene, Genprodukte und Antikörper verwiesen. Ferner können die Kits weitere Substanzen, wie reverse Transkriptase, DNA-Polymerase, Ligase, Puffer und Reagenzien, z.B. Markierungen, dNTPs, enthalten. Des weiteren können die erfindungsgemäßen Gene, Genprodukte, Antikörper und/oder Primerpaare markiert sein. Auch können sie frei vorliegen oder an einen festen Träger, z.B. ein Teströhrchen, eine Mikrotiterplatte, ein Teststäbchen, etc., immobilisiert sein. Die Kits können weiterhin geeignete Reagenzien zum Nachweis von Markierungen oder zur Markierung positiver und negativer Kontrollen, Waschlösungen, Verdünnungspuffer, etc. enthalten.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verfahren zur Immunisierung eines Individuums gegen MSI+ -Tumore und ihre Vorstufen, bei dem dem Individuum ein vorstehendes Gen in exprimierbarer Form oder ein durch dieses kodierte Genprodukt verabreicht wird. Es wird auf die vorstehenden Ausführungen hinsichtlich erfindungsgemäßer Gene und Genprodukte verwiesen.

Für die Verabreichung eines vorstehenden Gens kann dieses als RNA oder DNA, vorzugsweise als DNA vorliegen. Ferner kann es als solches, d.h. zusammen mit für seine Expression geeigneten Elementen, oder in Verbindung mit einem Vektor vorliegen. Beispiele solcher Elemente sind Promotoren und Enhancer, wie CMV-, SV40-, RSV-, Metallothionein I und Polyhedrin-Promotor bzw. CMV- und SV40-Enhancer. Weitere für die Expression geeignete Sequenzen gehen aus Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) hervor. Darüberhinaus können als Vektoren jegliche für die Expression in Säugerzellen geeignete Vektoren verwendet werden. Dies sind z.B. pcDNA3, pMSX, pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4 sowie von pcDNAI/amp, pcDNAI/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo und pHyg stammende Vektoren. Auch können als Vektoren rekombinante Viren, z.B. Adenovirus, Vaccinia-Virus oder Adeno-assoziiertes

Virus, verwendet werden.

Für die Verabreichung eines vorstehenden Genproduktes kann dieses als solches oder in Verbindung mit Trägern vorliegen. Günstig ist es, wenn die Träger im Individuum nicht als immunogen wirken. Solche Träger können Individuum-eigene oder -fremde Proteine bzw. Fragmente davon sein. Bevorzugt sind Träger, wie Serumalbumin, Fibrinogen oder Transferrin bzw. ein Fragment davon.

Mit einem vorstehenden Gen in exprimierbarer Form oder einem durch dieses kodierten Genprodukt kann ein Individuum immunisiert werden, das an einem MSI+ -Tumor erkranken kann oder bereits an einem solchen erkrankt ist. Beispiele eines solchen Individuums sind der Mensch und das Tier sowie Zellen von diesen. Die Immunisierung kann unter üblichen Bedingungen erfolgen, wobei die Menge des zu verabreichenden Gens bzw. des durch dieses kodierten Genproduktes leicht zu bestimmen ist. Sie hängt u.a. davon ab, ob die Immunisierung des Individuums mehr auf eine Induktion von gegen das Genprodukt gerichteten Antikörpern oder auf eine Stimulierung von gegen das Genprodukt gerichteten cytotoxischen T-Zellen, z.B. CD8⁺ T-Zellen, abzielt. Beide Möglichkeiten der Immunisierung können durch die vorliegende Erfindung erreicht werden. Desweiteren hängt die Menge davon ab, ob die Immunisierung als prophylaktische oder therapeutische Behandlung beabsichtigt ist. Darüber hinaus spricht das Alter, das Geschlecht und das Gewicht des Individuums sowie weitere klinische Parameter, z.B. Nieren-/Leberfunktion, eine Rolle für die Bestimmung der Menge. Günstig ist es, wenn dem Individuum 100µg - 1 g eines vorstehenden Genproduktes bzw. 10^6 - 10^{12} infektiöse Partikel eines rekombinanten, ein vorstehendes exprimierbares Gen enthaltenden Virus injiziert werden. Die Injektion kann an mehreren Stellen des Individuums intramuskulär, subkutan, intradermal oder in jeder anderen Applikationsform erfolgen. Ferner kann es günstig sein, ein oder mehrere "Booster-

Injektionen" mit ca. gleicher Menge durchzuführen.

Somit ermöglicht es die vorliegende Erfindung, MSI+ -Tumore diagnostisch zu erfassen. Ferner können diese Tumore auch prophylaktisch und therapeutisch angegangen werden.

Kurze Beschreibung der Figuren:

Figur 1:

Gene mit cMNR oder cDNR aus nicht-MSI+ -(Tumor)zellen

Figur 2:

Mutationen in cMNR oder cDNR aus MSI+-Tumoren und daraus resultierende Neo-Peptide. Ferner ist der Vergleich mit entsprechenden Genen aus nicht-MSI+(Tumor)zellen gezeigt.

Figur 3:

Untersuchung der mRNA-Expression in Dickdarmkrebs-Zelllinien über RT-PCR

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1: Allgemeine Verfahren

(A) Datenbank-Analysen

Für die Suche nach Mononukleotid- und Dinukleotid-Repeats in menschlichen kodierenden Sequenzen wurde die EMBL-Datenbank-Veröffentlichung (EMBL Rel.62, März 2000) zugrundegelegt. Eine Anzahl von Befehlsroutinen bzw. Programmen, sog. „Perl scripts“ (Wall et al., Programming Perl. O'Reilly & Associates, Inc., (1996)) wurde geschrieben, die alle menschlichen 109289-EMBL-Einträge hinsichtlich der Anwesenheit von kodierenden Sequenzen überprüften. Diese kodierenden Sequenzen wurden hinsichtlich der Anwesenheit von Mononukleotid- und Dinukleotid-Repeats mit mindestens 6 Basen (im Fall von Mononukleotid-Repeats) bzw. 8 Basen (im Fall von Dinukleotid-Repeats überprüft. Lediglich der

längste Repeat jedes Nukleotidtyps bei einem Datenbankeintrag-Kandidaten wurde als Mononukleotid-Repeat aufgezeichnet. Hinsichtlich der Dinukleotid-Repeats wurden alle 12 unterschiedlichen Arten von Dinukleotid-Repeats berücksichtigt. Einträge für cDNA und genomische DNA wurden getrennt behandelt; falls beide DNA-Arten für ein Gen zur Verfügung standen, wurde der genomischen Sequenz Priorität gegeben. Zusätzlich wurden verschiedene Filter verwendet. Beispielsweise wurden als Pseudogene ausgewiesene Einträge ausgeschlossen, da Pseudogene in der Regel nicht transkribiert werden. Somit handelt es sich bei solchen Repeats um nicht-kodierende Mikrosatelliten. Alle identifizierten Kandidaten-Sequenzen wurden in einer relationalen Datenbank für weitere Analysen gespeichert.

(B) Analyse von cMNR- und cDNR-Kandidatenlisten

Um die Analyse ungeeigneter Kandidaten-Sequenzen zu vermeiden, wurden alle Kandidaten ausgeschlossen, von denen bekannt war, dass es sich um Pseudogene oder Mitglieder der Immunglobulin-Familie handelt. Außerdem wurden alle Kandidaten ausgeschlossen, die die Repeats am äußersten 5'- oder 3'-Ende der bekannten Sequenz aufwiesen, sowie alle cMNR oder cDNR, die bei näherer Analyse der Primärdaten als Klonierungs- oder Sequenzierungsartefakte identifiziert werden konnten. Es wurden alle cMNR mit mehr als 9 A- und T-Repeats und alle C- oder G-Repeats mit 9 Repeat-Einheiten selektiert, da die Wahrscheinlichkeit der Mikrosatelliten-Instabilität in Tumoren mit dem Mutator-Phänotyp mit der Anzahl der Repeat-Einheiten ansteigt (Strauss et al., Nucleic Acids Res. 25 (1997), 806-813). Im Anschluß daran wurden zwei voneinander unabhängige BLAST-Analysen durchgeführt (Altschul et al., Nuc. Ac. Res. 25 (1997), 3389-3402). Somit wurde versucht, homologe als auch genomische Sequenzen zu identifizieren, um so die Exon/Intron-Übergänge der ausgewählten cDNAs identifizieren zu können, was die Bestätigung dafür gestattete, dass der Repeat-Bereich in der cDNA nicht aufgrund eines Splicing-Prozesses entstanden war. In einigen Fällen wurden Unterschiede zwischen den Repeat-

Sequenzen der cDNAs und denen von anderen veröffentlichten Sequenzen genau in dem Repeat-Bereich erhalten. Folglich mußte zur Verifizierung der Sequenzinformation in jedem Repeat-Bereich die genomische DNA sequenziert werden. Exon/Intron-Übergänge wurden durch MALIGN-Analyse (HUSAR-Software-Programmpaket) einer Kandidaten-cDNA und einer homologen genomischen DNA-Sequenz identifiziert.

(C) Zelllinien und Tumorproben

14 menschliche Dickdarmkrebszelllinien wurden hinsichtlich Mikrosatelliten-Änderungen in jedem vorstehenden Gen untersucht. Fünf der 14 Dickdarmkrebszelllinien sind als MSI+ klassifiziert (LoVo, KM12L4, HCT116, LS174T und SW48), während neun Zelllinien als MSI-niedrig oder MSI-negativ klassifiziert sind (CXF94, SW948, LS180, SW707, CaCo-2, HT29, Colo320DM, SW480 und CX-2). Die Zelllinien SW48 und HCT 116 wurden von der ECACC [<http://www.camr.org.uk/frame.htm>] bezogen. Die Linien HT29, SW707, SW948, CaCo 2, CX-2, CXF94, SW480, COLO320DM. LoVo, LS174T, und LS180 wurden durch die Tumorbank des Deutschen Krebsforschungszentrums bezogen. KM12L4 Zellen wurden von Dr. I.J. Fidler, MD Anderson Cancer Center, Houston, USA zur Verfügung gestellt. Ferner wurden 10 MSI+ CRC-Tumore analysiert, ein MSI+ Eierstocktumor (B190 TU) und zwei MSI-niedrige bzw. MSI-negative CRC-Tumore (B215 TU und B245 TU2). Die Paraffin-eingebetteten Tumoren wurden dem archivierten Material der Chirurgischen Universitätsklinik Heidelberg entnommen, bzw. durch das Institut für Pathologie Mannheim zur Verfügung gestellt. Genomische DNA der Tumor- und der entsprechenden durch Mikrodissektion mit Standardverfahren erhaltenen Mukosa-Proben wurden von Ch. Sutter zur Verfügung gestellt (Sutter et al., Mol. Cell Probes. 13 (1999), 157-165). Der MSI-Status wurde mittels des „NCI ICG-HNPCC“-Mikrosatellitenmarker-Panels (Boland et al., Cancer Res. 58 (1998), 5248-5257) sowie zusätzlich mittels Amplifikation der weiteren Mikrosatellitenmarker BAT40, ACTC, D13S153, D5S107 und D5S406 ermittelt.

(D) Genomische MSI-Analysen

Primer wurden mittels des im „HUSAR“-Programmpaket enthaltenen „PRIMER“-Programms entworfen und nach weiteren Bindungsstellen (Sequenzhomologen) zu anderen menschlichen Sequenzen durch eine „FASTA“-Analyse [HUSAR-Programmpaket] überprüft. Die Primerpositionen wurden so ausgewählt, dass sie möglichst nahe an dem Repeat-Bereich lagen, um so ein kurzes Amplimer mit einer Länge von etwa 100 bp zu erhalten. Dies war für eine genaue Fragmentanalyse der von in Paraffin eingebetteten Gewebeproben erhaltenen DNA optimal. Außerdem erwies sich dies als für die Analyse von Kandidaten mit unbekannter genomischer Struktur notwendig. Alle verwendeten Primer sind in der nachstehenden Tabelle 1 aufgelistet.

PCR-Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 25 µl (50 ng genomische DNA, 2,5 µl 10 x Reaktionspuffer (Life Technologies, Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 0,25 µM von jedem Primer und 0,5 E Taq DNA-Polmyrase (Life Technologies)) durchgeführt. Ein Primer war am 5'-Ende Fluoreszein-markiert. Nach einem initialen Denaturierungsschritt bei 94°C (4 min.) wurden 35 Zyklen bei 94°C Denaturierungstemperatur für 30'', unterschiedlichen Anlagerungstemperaturen je nach Primersystem bei 57°-63°C für 45'' und 72°C Extensionstemperatur für 30'' durchgeführt, danach schloß sich ein letzter Elongationsschritt bei 72° (6 min.) an. PCR-Produkte wurden auf einem 2% Agarose-Gel analysiert. Vor der Fragment-Analyse wurden die Amplifikationsprodukte 1:2 bis 1:10 verdünnt und 1 µl des verdünnten Produkts wurden mit 5 µl Auftragspuffer (0,6% „blue dextran“, 100% Formamid) vermischt. Die Proben wurden 3 min. bei 90° denaturiert und anschließend wurden die Fragmente auf einem „ALF“-DNA-Sequenzierungsgerät (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) unter Verwendung von 6,6% Polyacrylamid/7 M Harnstoff-Gelen elektrophoretisch

13
aufgetrennt. Die Größe, Höhe und das Profil der
Mikrosatelliten-Peaks wurde mittels der „AlleleLinks“-Software
(Amersham Pharmacia Biotech) analysiert.

Tabelle 1

Gen	PCR Primer für genomische DNA			PCR Primer für cDNA		
	sense 5'-3'	antisense 5'-3'		sense 5'-3'	antisense 5'-3'	
FLT3LG	GGG ATG ACG TGG TGG TG	GTG ATC CAG GGC TTC AGC		CCT ATC TCC TCC TGC TGC TG	GTG ATC CAG GGC TTC AGC	
SYCP1	CCC CTT CAT CTC TAA CAA CCC	CAC TGA TTC TCT GAA ATT AAA CAA ATA AC		CAG TGA AGA CAC CAA CAA AAC C	CAC TGA TTC TCT GAA ATT AAA CAA ATA AC	
SLC4A3	TGG AGT GGA TGA GGA AGA GG	CTT CTG TGG GGT CCC TGA G		TGG AGT GGA TGA GGA AGA GG	ATC TGT GGG CAC CTG CTG	
aCl	CCA GAA GCA AAT TCA CAA GAC	TTT TGC GTG TTC CTT CTT TC		CCA GAA GCA AAT TCA CAA GAC	CAC CCT CTC TCT TCT CCA GTA TTC	
PTHL3	TTT CAC TTT CAG TAC AGC ACT TCT G	GAA GTA ACA GGG GAC TCT TAA ATA ATG		GGG AAC TAA CAA GGT GGA GAC G	GAA GTA ACA GGG GAC TCT TAA ATA ATG	
SLC23A1	GAC TAC TAC GCC TGT GCA CG	TGT TTA TTG CGT GGA TGG G		AAA GGA TGG ACT GCG TAC AAG	AAG GAC GAG CCC AAA GAA G	
GART	AGT GTT GAA GAA TGG CTC CC	TGT TCC AGA TAT TAA GAC AGC CAC		GAA CAT CCC CAG AGT CCT CC	TGT TCC AGA TAT TAA GAC AGC CAC	
MAC30X	TGT TGC GGA GCC CCT AC	AAC CAC CCT GTA GGC ATC TC		CCT GGT TTA AGT CCT TTC TGT TTT	AAC CAC CCT GTA GGC ATC TC	
PRKDC	GAC TCA TGG ATG AAT TTA AAA TTG G	TTT GAA AAT AAC ATG TAA ATG CAT CTC		CAG CCC TGG ACC TTC TTA TTA A	GAC AAC CCC TTC AGA CAT CC	
ATR	TCT TCT GTA GGA ACT TGA AAG CC	TGA AAG CAA GTT TTA CTG GAC TAG G		AGC TCC CAT GAA GTA ATC CG	TGA AAG CAA GTT TTA CTG GAC TAG G	
MBD4	TGA CCA GTG AAG AAA ACA GCC	GTT TAT CAT GCC AGA AGT TTT TTG		TGA CCA GTG AAG AAA ACA GCC	GTG GTG GGG GGC TAA GAG	
SEC63	AGT AAA GGA CCC AAG AAA ACT GC	TGC TTT TGT TTC TGT TGC TTT G		TGA AAA GGA GCA GTC CAT CTG	TGC TTT TGT TGT TGT TGC TTT G	
OGT	TCA CTT TTG GCT GGT CAG AG	GGG AGG GAA AGG AGG TAA AG		TCA CTT TTG GCT GGT CAG AG	TGT CAA AAA TGC GTG CCT C	
HPDMPK	GCT TGA TCC TGT TGA TTT TCT ACT C	CTG AAT GGA GAA GAA AGT GAG ATG		TCC TAC TGG ATG TGC TGC C	CTG AAT GGA GAA GAA AGT GAG ATG	
U79260	TTT GTT ATA TCC CAT TAG GTG CC	AGC CTG GTG ACA GAG TGA GAC		CAT TAA GCA AAG CAG CCA GG	AGC CTG GTG ACA GAG TGA GAC	
DNRs	sense 5'-3'	antisense 5'-3'		sense 5'-3'	antisense 5'-3'	
KIAA0040	CAT CTC AAT ATG GTT CCC AAG TG	CTT CCC CAC GTA CCT GCT AC		CAA GAA GTA ACG TGG AAG GAG G	GTG CAT TAT TTC AGG GGT TCC	

(E) Bestätigung der Sequenz

Alle kodierenden Mikrosatelliten wurden durch „Thermocycle“-Sequenzierung bestätigt. PCR-Reaktionen wurden wie vorstehend beschrieben durchgeführt. PCR-Produkte wurden mittels des „QIAquick“-PCR-Reinigungskits (Qiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt und mit den entsprechenden Primern unter Verwendung des „Big Dye terminator cycle sequencing kit (Perkin Elmer, Darmstadt, Deutschland) sequenziert.

(F) Expressionsanalysen und cDNA-MSI-Analysen

Poly(A)RNA von 14 Dickdarmkrebszelllinien wurde mittels des Oligo(dT)-Zellulose-Verfahrens (Vennstrom und Bishop, Cell 28 (1982), 135-143) extrahiert. Die Qualität der RNA-Präparation und der Reversen Transkription wurde mittels GAPDH-Amplifikation (Hsu et al., Int. J. Cancer, 55: 397-401, 1993) überprüft. Primerpaare, die eine Differenzierung nach Größe zwischen cDNA- und eventuell als Kontamination enthaltenen genomischen DNA-Amplimeren erlaubten, wurden für die Expressionsanalyse durch semi-quantitative RT-PCR als geeignet erachtet. Im Fall einer unbekannten Exonstruktur wurden Primer entworfen, die auf der cDNA lokalisiert waren und es wurde überprüft, ob genomische PCR entweder dasselbe Amplifikationsprodukt ergab wie die RT-PCR, ein längeres oder überhaupt keines. Alle verwendeten Primer sind in Tabelle 1 aufgeführt. 100 ng poly(A+)RNA wurden mittels 0,5 µg oligo(dT)₁₂₋₁₈ in einem Endvolumen von 20 µl mit 200 Einheiten M-MLV Reverser Transkriptase (SuperScript, Life Technologies) 1 Stunde bei 37°C revers transkribiert. Zur Überprüfung der RNA-Integrität und der Synthese des ersten cDNA-Strangs wurden Kontroll-PCR-Reaktionen mittels GAPDH-spezifischen Primern durchgeführt (Hsu et al., Int. J. Cancer 55 (1993), 397-401). PCR-Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl (1 µl cDNA, 5 µl 10 x Reaktionspuffer (Life Technologies), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 0,25 µM von jedem Primer und 0,5 Einheiten Taq DNA-Polymerase (Life Technologies) mittels des vorstehend für die Amplifikation

genomischer DNA beschriebenen Amplifikationsprotokolls durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf 2% Agarose-Gelen aufgetrennt und über Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht.

PCR-Reaktionen für cDNA-MSI-Analysen wurden wie für die Expressionsanalysen beschrieben durchgeführt, außer dass ein am 5'-Ende mit Fluoreszein markierter Primer verwendet wurde. Die Fragmentanalyse wurde wie für die genomische Analyse beschrieben durchgeführt.

Beispiel 2: Computergestützte Analysen

Die Computer-Datenbank-Sequenzanalyse ergab 365 Kandidaten für Mononukleotid-Repeats mit einer Minimallänge von 9 Basen (Gesamt: 17654 Mononukleotid-Repeats mit einer Länge von ≥ 6 Basen). Ferner wurden 2028 Dinukleotid-Repeats mit einer Minimallänge von 8 Basen gefunden. Der längste Mononukleotid-Bereich umfasste 32 Basen und der längste Dinukleotid-Bereich 42 Basen, d.h., 21 Repeat-Einheiten.

Beispiel 3: Identifizierung von cMNR

Hierfür wurden alle cMNR mit 10 oder mehr Repeat-Einheiten und alle C- oder G-Repeat-Bereiche mit 9 oder mehr Repeat-Einheiten analysiert, da davon ausgegangen wurde, dass in den längeren Repeat-Bereichen eine höhere Mutationrate vorlag. Außerdem wurden alle Kandidaten-Sequenzen, die weitere Ausschlusskriterien erfüllten, von einer Analyse ausgeschlossen. Somit wurden insgesamt 43 cMNR Kandidaten-Sequenzen erhalten, die 12 Duplikate umfaßten, wodurch 31 verschiedene Kandidaten-Sequenzen ausgewählt wurden.

Diese Kandidaten-Sequenzen mußten experimentell als Mikrosatelliten in kodierenden Bereichen verifiziert werden. Daher mußten die Repeat-Bereiche flankierende Primer für jede Kandidaten-Sequenz entworfen werden. Die vollständige Information über die genomische Struktur konnte mittels eines Sequenzvergleichs der cDNAs mit Datenbanken für die genomische

Sequenz erhalten werden. Der systematische Sequenzvergleich lieferte Informationen über Exon/Intron-Übergänge und kodierende Bereiche für 9 der 31 Kandidaten-Sequenzen.

Daher mußten für die restlichen 22 cDNA-Sequenzen ohne veröffentlichte genomische Struktur Primerpaare auf der Basis der cDNA-Sequenz entworfen werden. Die Amplifikation der Repeat-Bereiche sowohl in der cDNA als auch der entsprechenden genomischen DNA ergab identische PCR-Produkte in weiteren 9 der 22 Kandidaten, was zeigt, dass diese 9 Sequenzen den Mononukleotid-Bereich in einem kodierenden Bereich enthalten. Die PCR-Reaktion der genomischen DNA-Sequenzen verlief in 13 Mononukleotid-Bereichen negativ oder ergab längere Amplimere als über die Amplifikation der entsprechenden cDNA. Für jede dieser Kandidaten-Sequenzen war somit eine weitere Analyse der genomischen Struktur des entsprechenden Gens erforderlich. Insgesamt wurden 18 Mononukleotid-Bereiche einer Sequenzanalyse unterzogen.

Repeat-Bereiche konnten in 17 der 18 Fälle durch Sequenzanalysen bestätigt werden. Nur ein Kandidat zeigte nicht das erwartete A₁₄-Repeat. In zwei Kandidaten-Sequenzen lag der Repeat-Bereich innerhalb der vorhergesagten kodierenden Sequenz der genomischen DNA-Sequenzen, eine Expression konnte jedoch mittels RT-PCR-Analysen nicht nachgewiesen werden. Außerdem war keine Information hinsichtlich ESTs oder einer partiellen kodierenden Sequenz identifizierbar, die zu dem Repeat-Bereich homolog war. Diese Untersuchungen wurden mittels der „EST Clustering software“ durchgeführt (Husar-Programmpaket). Somit lieferte die Sequenzanalyse zusammen mit den bestätigenden Experimenten die Basis für die Identifizierung von 15 cMNR (vgl. Fig. 1).

Beispiel 4: Nachweis von cDNR

Für die cDNR wurden die gleichen Strategien für die Sequenzanalyse und die experimentelle Bestätigung der Sequenz-

daten angewandt, wobei mit den längsten cDNR-Kandidaten begonnen wurde. Nach Identifizierung von cDNA-Sequenzen von 4 cDNR-Kandidaten wurde der MSI-Status in MSI+ und MSI-Dickdarmkrebszelllinien und MSI+ Tumoren analysiert. Einer dieser Kandidaten ((AC),) zeigte eine Mutation in einem MSI+ Tumor, jedoch keine Mutation in den nicht-MSI+ (Tumor)zellen (vgl. Fig. 2). Es wird davon ausgegangen, dass bei cDNR, deren Repeat-Anzahl höher als 9 ist, die Mutationsrate erhöht ist.

Beispiel 5: Untersuchungen zu Mutationsraten der cMNR

Im einzelnen wurden variierende Mutationsraten im Bereich von 40 bis 80% in den drei C₉-cMNR beobachtet und von 10 bis 100% in den A₁₀-cMNR, während die T₁₀- und N₂₁₁-cMNR konstant höhere Mutationsraten zwischen 75 und 100% zeigten. Bei drei cMNR-Markern ((SYCP1 (A10), ATR (A10), und MBD4 (A10)) konnten in MSI+ - Zelllinien und Tumorproben nur geringe Mutationsfrequenzen nachgewiesen werden. In MSI+ Zelllinien und MSI+ Tumoren wurden jedoch für die beiden cMNR-Marker (HPDMPK (T14) und U79260 (T14)) hohe Mutationsraten nachgewiesen: Alle 5 MSI+ Zelllinien und 10 von 11 MSI+ Tumoren zeigten eine Sequenzänderung hinsichtlich HPDMPK. Analoge Ergebnisse wurden für die Mono-cMNR im U79260-Gen gefunden, das in allen 5 MSI+ Zelllinien und 9 von 11 MSI+ Tumoren mutiert war (vgl. nachstehende Tabelle 2).

Tabelle 2: Frequenz von Mutationen in cMNR in MSI+
Tumorzelllinien und MSI+ Tumoren.

Gen	Repeat	LoVo	KM12	HCT116	LS174T	SW48	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11
FLT3LG	C ₉	•	•	o	o	•	o	o	•	•	o	•	•	o	o		o
SYCP1	A ₁₀	•	o	o	o	o	•	o	o	o	•	o	o	o	o	o	o
SLC4A3	C ₉	o	•	o	•	o	o	o	•	o	O	o	o	o	o	•	o
aC1	T ₁₀	•	o	o	•	•	•	•	•	•	O	•	•	o	o	•	o
PTHL3	A ₁₁	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	o	•	•	•	•	•
SLC23A1	C ₉	o	•	•	•	•	•	•	o	o	•	o	•	•	•	o	o
GART	A ₁₀	o	•	o	o	•	o	•	o	o	O	o	o	•	•	o	o
MAC30X	A ₁₀	o	o	•	o	o	o	•	o	o	O	o	•	o	o	o	o
PRKDC	A ₁₀	o	•	o	o	o	•	•	o	o	O	o	o	•	•	o	o
ATR	A ₁₀	o	o	o	o	o	•	o	o	o		o	o	o	o	•	o
MBD4	A ₁₀	o	o	•	o	o	o	o	o	o	O	o	o	o	o	o	o
SEC63	A ₁₀	•	•	•	•	•	o	•	•	•	•	o	•	•	•	•	o
OGT	T ₁₀	•	•	o	•	o	o	o	o	•	•	o	•	•	•	o	o
HPDMPK	T ₁₄	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	o	•	•	•	•	•
U79260	T ₁₄	•	•	•	•	•	•	o	•	•	•	o	•	•	•	•	•

o Mutation nicht vorhanden, • Mutation vorhanden.

Beispiel 6: Expressionsanalysen von cMNR

Die Expressionsspiegel der vorstehenden 15 cMNR enthaltenden Gene unterschieden sich stark und schwankten zwischen nicht nachweisbarer Expression und konstant starker Transkriptionsaktivität in allen 14 getesteten Dickdarmkrebszelllinien. Das an der Meiose beteiligte SYCP1-Gen und das für den hämatopoetischen Wachstumsfaktor FLT3LG kodierende Gen wurden in Dickdarmkrebszelllinien nicht exprimiert. Das Gen HPDMPK, das stromabwärts des Genlocus für zwei mit myotonischer Dystrophie (Dystrophia myotonica) assoziierter Gene liegt und für ein hypothetisches Protein kodiert und das für das ER-Membranprotein SEC63 kodierende Gen wurden in allen Zelllinien

nicht sehr stark, jedoch konstant exprimiert. Die aCl-mRNA und die Splice-Variante 3 des PTHrP-Gens (PTHrP3) wurden in Dickdarmkrebszelllinien in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert. Beide Gene wurden in etwa 50% der untersuchten Zelllinien exprimiert. Das für die trifunktionelle Ribonukleotidsynthetase kodierende Gen GART, das für die DNA-abhängige Proteinkinase kodierende Gen PRKDC und das mit dem Zellzyklus in Zusammenhang stehende Gen ATR wurden in Dickdarmzelllinien hoch-exprimiert. Auch wird MAC30X in Dickdarmkrebszelllinien hoch exprimiert (vgl. Fig. 3). Zusammengefaßt kann jedoch festgestellt werden, dass die Expressionsspiegel der betreffenden Gene mit dem MSI-Status der betroffenen Zelllinien nicht korrelieren.

Beispiel 7: MSI-Analyse von cDNAs

Es wurde eine Fragmentanalyse amplifizierter cDNAs der vorstehenden cMNR von 14 Dickdarmkrebszelllinien durchgeführt: Drei cMNR zeigten die Wildtyp-cDNA in betroffenen Zelllinien (GART) oder in den meisten betroffenen Zelllinien (SEC63). Bei sieben cMNR herrschte Übereinstimmung zwischen den genomischen und transkribierten Sequenzen (MAC30X, HPDMPK, U79260, MBD4 und ATR).

Beispiel 8: Stimulierung von CD8⁺-T Zellen gegen ein vorstehendes Genprodukt und Lyse von dieses Genprodukt exprimierenden MSI⁺-Tumorzellen.

(a) Stimulierung von CD8⁺-T-Zellen gegen ein erfindungsgemäßes Neo-Peptid.

Periphere Blutlymphozyten (PBL) wurden von einem HLA-A0201 positiven gesunden Probanden durch Dichtezentrifugation über einen Ficoll Paque®-Gradienten aufgereinigt. T-Lymphozyten wurden durch Abtrennung der B-Lymphozyten bzw. der Monozyten mit Hilfe Antikörper gekoppelter Magnetobeads (CD11, CD16, CD19, CD36 und CD56) (Pan T-cell isolation Kit®, Milteny, Bergisch Gladbach, Germany) gewonnen. Aus 30 ml Blut wurden

etwa 2×10^7 T-Zellen gewonnen. Von diesen wurden etwa 2×10^6 T-Zellen mit autologen über CD40 aktivierten B-Zellen (etwa 5×10^5), die mit einem der HLA-A0201 restringierten Neo-Peptide der nachstehenden Tabelle 3 (vgl. auch Fig. 2) beladen worden waren, stimuliert, d.h. in 24 Lochplatten kokultiviert. Diese Stimulierung wurde fünf bis sechs Wochen lang wöchentlich wiederholt.

Tabelle 3: Beispiele von HLA-A0201 restringierten Neo-Peptiden, die durch mutierte cMNR kodiert sind.

Peptid-#	Gen	Peptid-länge	AS-Sequenz des identifizierten Neo-Peptids
#15	HPDMPK	9mer	FLSASHFLL
#16	OGT	10mer	SLYKFSPFPL
#21	U79260	9mer	TLSPGWSAV

Mittels bekannter IFN-gamma ELISpotanalyse wurde die Reaktivität gegenüber den Neo-Peptiden, beginnend an Tag 0, wöchentlich bestimmt. Am Tag 28 wurde eine Reaktivität von 1760 spezifische Zellen / 1000000 Zellen gegen das Peptid #16 (SLYKFSPFPL), am Tag 35 von 1123 spezifische Zellen / 1000000 Zellen gegen das Peptid #15 (FLSASHFLL) und von 733 spezifische Zellen / 1000000 Zellen gegen das Peptid #21 (TLSPGWSAV) beobachtet. Die Stärke der Reaktion lag somit in Bereichen, die man normalerweise nur mit viralen Antigenen erreicht, der Wert für das Peptid GILGFVFTL, welches von einem Matrixprotein des Influenzavirus abgeleitet war, lag am Tag 35 bei 1170 spezifische Zellen / 1000000 Zellen. Somit wird deutlich, dass gegen die erfindungsgemäßen Neo-Peptide aktivierte CD8⁺-T-Zellen stimuliert werden können.

(b) Lyse von Zellen, die mit erfindungsgemäßen Neo-Peptiden beladen wurden

Nach einer weiteren Restimulierung wurde das zytotoxische

Potential der aktivierten $CD8^+$ -T-Zellen gegen die mit den Neo-Peptiden beladenen HLA-A2.1⁺ Colonicarcinomzelllinien SW 480 und HCT 116, sowie T2-Zellen getestet. Als Kontrolle dienten unbeladene Zellen. Jeweils 1×10^6 Zellen wurden mit ^{51}Cr (100 μCi) für 1h bei 37°C radioaktiv markiert und mit steigenden Mengen an aktivierten $CD8^+$ -T-Zellen für 4h kokultiviert. Durch die Messung der freigesetzten Radioaktivität im Überstand wurde die spezifische Lyse der jeweiligen Zelllinie bestimmt. Es zeigte sich, dass die HLA-A0201 exprimierenden Zelllinien lysiert werden können, wenn sie mit Neo-Peptiden beladen sind, unbeladene Zellen werden nicht lysiert.

Ferner wurden Kompetitions-Experimente durchgeführt. Durch Zugabe von einem Überschuss (50 „kalte“ zu 1 „heissen“ Neo-Peptid beladenen Zelle) Neo-Peptid beladener, jedoch nicht radioaktiv markierter T2-Zellen zu einem Reaktionsansatz mit radioaktiv markierten, Neo-Peptid beladenen T2-Zellen und aktivierten $CD8^+$ -T-Zellen konnte die Freisetzung von Radioaktivität und damit die spezifische cytotoxische Aktivität der T-Zellen kompetiert werden. Somit wird deutlich, dass die gegen die Neo-Peptide gerichteten $CD8^+$ -T-Zellen spezifisch die Neo-Peptide exprimierenden Tumorzellen erkennen und lysieren.

Patentansprüche

1. Gene mit kodierenden Mononukleotid-Mikrosatelliten (cMNR) oder Dinukleotid-Mikrosatelliten (cDNR), wobei die Gene aus MSI+ -Tumorzellen isolierbar sind und sich von den entsprechenden Genen aus nicht-MSI+(Tumor)zellen durch Mutationen in den cMNR oder cDNR unterscheiden und für Neo-Peptide umfassende Genprodukte kodieren.
2. Gene nach Anspruch 1, wobei die entsprechenden Gene aus nicht-MSI+(Tumor)zellen jene von Fig. 1 sind.
3. Gene nach Anspruch 1 oder 2, wobei die aus MSI+- Tumorzellen isolierbaren Gene die in Fig. 2 angegebenen Mutationen aufweisen.
4. Genprodukte, kodiert durch die aus MSI+- Tumorzellen isolierbaren Gene nach einem der Ansprüche 1-3.
5. Antikörper, gerichtet gegen die Genprodukte nach Anspruch 4.
6. Verfahren zur Identifizierung von aus MSI+-Tumorzellen isolierbaren Genen mit cMNR oder cDNR nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei dem man in Datenbanken von nicht-MSI+(Tumor)zellen nach cMNR oder cDNR enthaltenden Gen-Sequenzen sucht, diese zur Auffindung gleicher Gene in MSI+ -Tumorzellen verwendet und letztere Gene dahingehend selektioniert, daß sie gegenüber den Gen-Sequenzen aus den nicht-MSI+(Tumor)zellen Mutationen in den cMNR oder cDNR aufweisen und für Neo-Peptide umfassende Genprodukte kodieren.
7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei zur Auffindung der gleichen Gene in MSI+ -Tumorzellen eine PCR-Reaktion mit Primern durchgeführt wird, die aus den cMNR oder cDNR umfassenden Gen-Sequenzen entwickelt sind.

8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, wobei die Primer jene von Tabelle 1 sind.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6-8, wobei auf solche Gene aus den MSI+ -Tumorzellen selektioniert wird, die in MSI+ -Tumorzellen verschiedener MSI+ -Tumoren gleichen Typs mit einer Häufigkeit von 1 % - 100 % vorliegen.

10. Kit, umfassend einen oder mehrere Vertreter eines Gens nach einem der Ansprüche 1 bis 3, eines Genprodukts nach Anspruch 4, eines Antikörpers nach Anspruch 5 und/oder eines Primerpaares von Tabelle 1.

11. Verwendung der Gene nach einem der Ansprüche 1 bis 3, der Genprodukte nach Anspruch 4, der Antikörper nach Anspruch 5 oder der Kits nach Anspruch 10 zur molekularen Untersuchung von MSI+ -Tumoren und ihren Vorstufen sowie zu deren Diagnose.

12. Verwendung der Gene in exprimierbarer Form nach einem der Ansprüche 1-3 oder der Genprodukte nach Anspruch 4 zur Immunisierung eines Individuums gegen MSI+ -Tumore und ihre Vorstufen.

13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei die Immunisierung im Rahmen einer prophylaktischen und/oder therapeutischen Behandlung von MSI+-Tumoren erfolgt.

Figur 1

Gen	Acc. no.	Chr.
MNRs		
FLT3LG	U29874	19q13.3
SYCP1	X95654	1p13-12
SLC4A3	U05596	2q36
aC1	D82070	4
PTHL3	M24350	12p12-11
SLC23A1	AF058319	20p13
GART	X54199	21q22.1
MAC30X	L19183	17
PRKDC	U63630	8Q11
ATR	U76308	3q22-24
MBD4	AF072250	3q21-24
SEC63	AF100141	6q16-22
OGT	U77413	X?
HPDMPK	Y10936	19q13.3
U79260	U79260	16
DNRs		
KIAA0040	D25539	1q24-25

Bezeichnung	Beschreibung Nukleotid-/ Peptidsequenz	Repeat
<u>CMNRs:</u>		
SLC4A3		C ₉
	wt	...CTGAGGCAGAACCTGTGGAGCCCCCCCCCTCAGGACCCACAGAAGGC...
	+1	...CTGAGGCAGAACCTGTGGAGCCCCCCCCCTCAGGACCCACAGAAGGC...
	neo	...EAEVVEPPPLRDPTEGKVLHWK
FTL3LG		C ₉
	wt	...TCTCCCTCCCTGCTCCAGCCCCCCCCCAGCTGTCTTCGCTTCGTCCA...
	-1	...TCTCCCTCCCTGCTCCAGCCCCCCCCCAGCTGTCTTCGCTTCGTCCA...
	neo	...VTKCAFQPPPAVFASSRPTSPASCRPPSSWWR
SLC23A1		C ₉
	wt	...CACGGCTGTCCTGTGCCCCACCCCCCCCCCATCCACGCAATAAACAGGGG...
	-1	...CACGGCTGTCCTGTGCCCCACCCCCCCCCCATCCACGCAATAAACAGGGG...
	neo	...ARLSCAPPPPSIQ
	+1	...CACGGCTGTCCTGTGCCCCACCCCCCCCCCATCCACGCAATAAACAGGGG...
	neo	...ARLSCAPPPPHPRNKQGNFRPLLCIS
GART		A ₁₀
	wt	...GACAAATCATTTCTCTTTTGAAAAAAGGCCAGAGTGGCTGTCTTA...
	-1	...GACAAATCATTTCTCTTTTGAAAAAAGGCCAGAGTGGCTGTCTTA...
	neo	...LTNHSFEKKRPEWLS

MAC30X	wt	A ₁₀	...TACAAGTATGAAGAGAAAAAATAATGAAGGAAACAACCACTGG...
	-1		...TACAAGTATGAAGAGAAAAAATAATGAAGGAAACAACCACTGG...
	neo		...YKYEKKRKNNEGNNHWPRVEMPTGWLLVGYIQEHCSSEPTSSAFETLAA... ...MHKSKMVSGMTMSNPHELLPFFFF
PRKDC	wt	A ₁₀	...TCTATGGAGAACTTGCAATGAAAAAATAACAGATACAGGTGAGAT...
	-1		...TCTATGGAGAACTTGCAATGAAAAAATAACAGATACAGGTGAGAT...
	neo		...FYGELALKKKYQIQF
ATR	wt	A ₁₀	...AGCCATTCCCTTTCTACTGAAAAAATACTAGTCCAGTAAACT...
	-1		...AGCCATTCCCTTTCTACTGAAAAAATACTAGTCCAGTAAACT...
	neo		...KPFLLKKKYLVO
SYCP1	wt	A ₁₀	...GTAATTGCTAAATGGATAGAAAAAATACTAAAGAGCTGAAAAGT...
	-1		...GTAATTGCTAAATGGATAGAAAAAATACTAAAGAGCTGAAAAGT...
	neo		...AVIAKMDRKN
	+1		...GTAATTGCTAAATGGATAGAAAAAATACTAAAGAGCTGAAAAGT...
	neo		...AVIAKMDRKKTKRS
MBD4	wt	A ₁₀	...AGTGAAGAAAAACAGCCTTGTAATAAAGAAAGATCATTGAGTTCAG...
	-1		...AGTGAAGAAAAACAGCCTTGTAATAAAGAAAGATCATTGAGTTCAG...
	neo		...SVTSEENSLVKKKKDH

SEC63

wt ...TCAAAAAAAAAAGAAACCTTTAAAAAAAACCTACACCTGTGCTATTAC...
 -1 ...TCAAAAAAAAAAGAAACCTTTAAAAAAAACCTACACCTGTGCTATTAC...
 neo ...KSKKKKPLKKNLHLCYHQSQRNKRKSRMESLGMKLQ

aC1

wt ...AAAGAACCAATTTTACAAATTTTTCCTGTCAGTTGAATTTGGG...
 -1 ...AAAGAACCAATTTTACAAATTTTTCCTGTCAGTTGAATTTGGG...
 neo ...SKNQFTIFFSCQLNLGRKEHAKITFFEQDITMDGNPGELELQLOIKQSONALLPAGPLTQTPV

OGT

wt ...TTCCCCCCTCCCCCAATCTTTTTCCTTCCCTTACAAATTTCCCC...
 -1 ...TTCCCCCCTCCCCCAATCTTTTTCCTTCCCTTACAAATTTCCCC...
 neo ...SSPPPPNLFSLYKFSPPPLPPFPPIFFH

PTHL3

wt ...CAGCACTTCTGTGGGGTTTGAAAAAAGGAAAAACAAGAAAGAAC...
 -1 ...CAGCACTTCTGTGGGGTTTGAAAAAAGGAAAAACAAGAAAGAAC...
 neo ...TALLWGLKKRKTTTEHHHCN

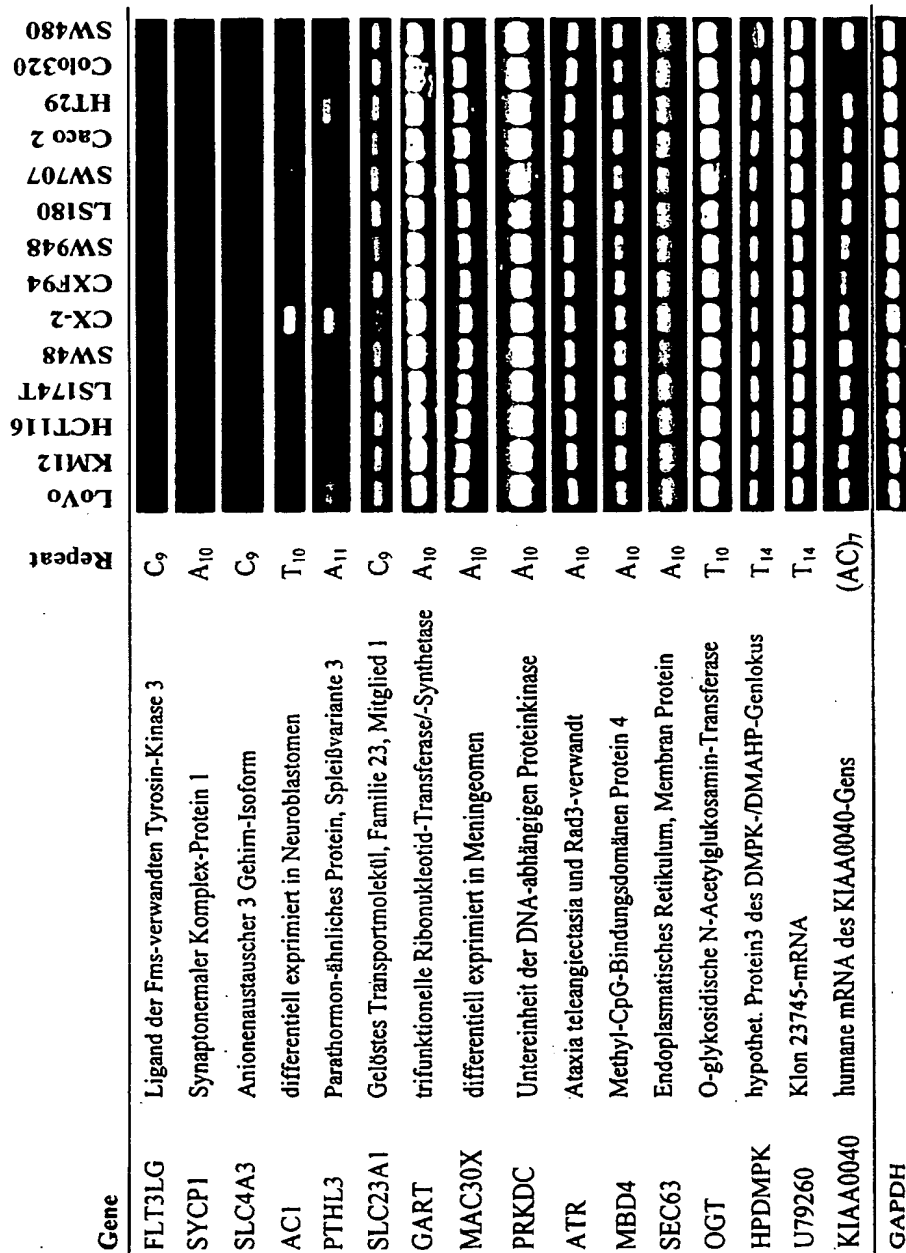
HPDMPK

wt ...TGGACCCCTCTGAGAAGGGTGT...TATCAGCATCTCACTI...
 -1/-4 ...TGGACCCCTCTGAGAAGGGTGT...TATCAGCATCTCACTI...
 neo ...AVDPLRRVFF₇ISISLSSPSPNPLPAMLSTPRTHQQGADGS
 -2/-5 ...TGGACCCCTCTGAGAAGGGTGT...TATCAGCATCTCACTI...
 neo ...AVDPLRRVFF₇LSASHFLHSAFTPSLPCFPPOGPTSREQTAA₁₅NGTI (peptide #15)
 -3 ...TGGACCCCTCTGAGAAGGGTGT...TATCAGCATCTCACTI...
 verkürzt ...AVDPLRRVFFYQHLLTFFSIQOPPPCHAFHPKDPAGSRRQLLVPLKGPPLAPILS...

...GCATTTCTTTTCTTTCTTTTCTTTTCTTTTGTGAGACACAGTCTCAC...
 ...GCATTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTGTGAGACACAGTCTCAC...
 ...HFLSFLFFFLRHSLTSPGWSAVARSRLTATSASQVQVILLPPPEWLGLQARAAAPS
 ...GCATTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTGTGAGACACAGTCTCAC...
 ...HFLSFLFF

...GTGTGTGCACATGCACGTAAACACACACACACACAAATTCAGGTAGCAG...
 ...GTGTGTGCACATGCACGTAAACACACACACACACAAATTCAGGTAGCAG...
 ...VHMHVTHTHTIQVAGTWSIFCSSNGHWLCTLCREVHYLQSOKCLMGK...
 ...PCQIQTHIYNELTSKAPIHHLFHKPLRLQMHAFLLTLHINFYWKYS

Figur 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
17. Januar 2002 (17.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/004664 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68**,
C07K 14/47

(74) **Anwalt: HUBER, Bernard**; Huber & Schüssler, Trud-
eringer Strasse 246, 81825 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/02510

(81) **Bestimmungsstaaten (national)**: AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:
4. Juli 2001 (04.07.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 32 608.0 7. Juli 2000 (07.07.2000) DE

(84) **Bestimmungsstaaten (regional)**: ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder und

(72) **Erfinder: KNEBEL DOEBERITZ, von, Magnus**
[DE/DE]; Chirurgische Universitätsklinik, Sektion
Molekulare Diagnostik und Therapie, Im Neuenheimer
Feld 110, 69120 Heidelberg (DE).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(72) Erfinder; und

(75) **Erfinder/Anmelder (nur für US): BORK, Peer** [DE/DE];
Maxerhofstr. 1, 69118 Heidelberg (DE). **YUAN, Yan,**
Ping [DE/DE]; Mayerhofstr. 1, 69118 Heidelberg (DE).
GEBERT, Johannes [DE/DE]; Chirurgische Universitäts-
klinik, Im Neuenheimer Feld 110, 69120 Heidelberg
(DE). **WÖRNER, Stefan** [DE/DE]; Chirurgische Univer-
sitätsklinik, Im Neuenheimer Feld 110, 69120 Heidelberg
(DE). **LINNEBACHER, Michael** [DE/DE]; Chirurgische
Universitätsklinik, Im Neuenheimer Feld 110, 69120
Heidelberg (DE).

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen**
Recherchenberichts: 19. Juni 2003

(15) **Informationen zur Berichtigung:**

Frühere Berichtigung:

siehe PCT Gazette Nr. 38/2002 vom 19. September 2002,
Section II

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

(54) **Title:** GENES COMPRISING CODING MONONUCLEOTIDE MICROSATELLITES OR DINUCLEOTIDE MI-
CROSATELLITES THAT CAN BE ISOLATED FROM TUMOUR CELLS

A3 (54) **Bezeichnung:** AUS TUMORZELLEN ISOLIERBARE GENE MIT KODIERENDEN MONONUCLEOTID- ODER DINU-
CLEOTID-MIKROSATELLITEN

(57) **Abstract:** The invention relates to genes comprising coding mononucleotide microsatellites (cMNR) or dinucleotide microsatel-
lites (cDNR). The genes can be isolated from MSI+ tumour cells. Said genes differ from corresponding genes from non-MSI+ (tu-
mour) cells by mutations in the cMNR or cDNR and code for gene products including neopeptides. The invention also relates to the
use of the genes and their gene products for the prevention, diagnosis and/or therapy of MSI+ tumours.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft Gene mit kodierenden Mononukleotid-Mikrosatelliten (cMNR) oder
Dinukleotid-Mikrosatelliten (cDNR), wobei die Gene aus MSI+ -Tumorzellen isolierbar sind und sich von den entsprechenden
Genen aus nicht-MSI+ (Tumor)zellen durch Mutationen in den cMNR oder cDNR unterscheiden und für Neo-Peptide umfassende
Genprodukte kodieren. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der Gene bzw. deren Genprodukte zur Prävention, Diagnose
und/Therapie von MSI+ -Tumoren.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 01/02510

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68 C07K14/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, SEQUENCE SEARCH, MEDLINE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AKIMOTO YOSHIHIRO ET AL: "Localization of the O-linked N-acetylglucosamine transferase in rat pancreas." DIABETES, vol. 48, no. 12, December 1999 (1999-12), pages 2407-2413, XP001120467 ISSN: 0012-1797 Zusammenfassung, S. 2408, Spalte 1, "Antibodies" ----- -/-	5

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 January 2003

Date of mailing of the international search report

1 0. 03. 03

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Luzzatto, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/SA/210 01/02510

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MIRONOV N ET AL: "A novel sensitive method to detect frameshift mutations in exonic repeat sequences of cancer-related genes." CARCINOGENESIS. ENGLAND NOV 1999, vol. 20, no. 11, November 1999 (1999-11), pages 2189-2192, XP002229558 ISSN: 0143-3334 the whole document	1-4, 11
X	----- DATABASE EBI 'Online! RC1-HT0256-271099-011-d07 HT0256 H. sapiens cDNA, 6 February 2000 (2000-02-06) SIMPSON A.J.G.: "The FAPESP/LICR human cancer genome project" Database accession no. AW379874 XP002229502 abstract	1-4
X	----- RICCIO A ET AL: "The DNA repair gene MBD4 (MED1) is mutated in human carcinomas with microsatellite instability." NATURE GENETICS. UNITED STATES NOV 1999, vol. 23, no. 3, November 1999 (1999-11), pages 266-268, XP002229559 ISSN: 1061-4036 the whole document	1-4, 11
A	----- OUYANG H ET AL: "The insulin-like growth factor II receptor gene is mutated in genetically unstable cancers of the endometrium, stomach, and colorectum." CANCER RESEARCH. UNITED STATES 15 MAY 1997, vol. 57, no. 10, 15 May 1997 (1997-05-15), pages 1851-1854, XP001119572 ISSN: 0008-5472 abstract	6
A	----- CALIN G ET AL: "The coding region of the Bloom syndrome BLM gene and of the CBL proto-oncogene is mutated in genetically unstable sporadic gastrointestinal tumors." CANCER RESEARCH. UNITED STATES 1 SEP 1998, vol. 58, no. 17, 1 September 1998 (1998-09-01), pages 3777-3781, XP001120180 ISSN: 0008-5472 the whole document	6, 7, 9
A	----- US 5 741 650 A (LAPIDUS STANLEY N ET AL) 21 April 1998 (1998-04-21) column 16, line 6 - line 60	6, 7, 9
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No

/DE 01/02510

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FURUTA K ET AL: "GENE MUTATION OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA1 TYPE II RECEPTOR IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, NEW YORK, NY, US, vol. 81, no. 6, 11 June 1999 (1999-06-11), pages 851-853, XP001085381 ISSN: 0020-7136 abstract	1
A	DUVAL A ET AL: "VARIABLE MUTATION FREQUENCIES IN CODING REPEATS OF TCF-4 AND OTHER TARGET GENES IN COLON, GASTRIC AND ENDOMETRIAL CARCINOMA SHOWING MICROSATELLITE INSTABILITY" ONCOGENE, BASINGSTOKE, HANTS, GB, vol. 18, no. 48, 18 November 1999 (1999-11-18), pages 6806-6809, XP000882123 ISSN: 0950-9232 abstract; figures 1,2	1
A	PERCESEPE A ET AL: "Genomic instability and target gene mutations in colon cancers with different degrees of allelic shifts." GENES, CHROMOSOMES & CANCER. UNITED STATES APR 2000, vol. 27, no. 4, April 2000 (2000-04), pages 424-429, XP002221119 ISSN: 1045-2257 abstract; table 2	1
A	RAMPINO ET AL: "Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 275, 14 February 1997 (1997-02-14), pages 967-969, XP002092054 ISSN: 0036-8075 abstract	1
A	SAKAO YUKINORI ET AL: "Microsatellite instability and frameshift mutations in the bax gene hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma." JAPANESE JOURNAL OF CANCER RESEARCH, vol. 89, no. 10, October 1998 (1998-10), pages 1020-1027, XP002221572 ISSN: 0910-5050 abstract; table 4	1,5

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC 01/02510

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE EBI 'Online! Synaptonemal complex protein 1, 15 July 1998 (1998-07-15) Database accession no. q15431 XP002229492 abstract & MEUWISSEN R.L.J. ET AL.: "Human synaptonemal complex protein 1 (SCP1): isolation and characterization of the cDNA and chromosomal localization of the gene" GENOMICS, vol. 39, 1997, pages 377-384,</p>	
A	<p>DATABASE EBI 'Online! Methyl-Cpg binding protein MBD4, 1 May 1999 (1999-05-01) HENDRICH B. ET AL.: Database accession no. 095243 XP002229493 abstract</p>	1-4
L	<p>DATABASE EBI 'Online! sequence 370 from patent W00212328, 18 May 2002 (2002-05-18) Database accession no. AX396155 XP002229495 (erwähnt, um Information über die in WO-A-0212328 offenbarte relevante Sequenz zu geben) abstract</p>	1-4
E	<p>& WO 02 12328 A (CORIXA CORP.) 14 February 2002 (2002-02-14)</p>	
A	<p>DATABASE EBI 'Online! Human MAC30 mRNA, 3' end, 14 July 1993 (1993-07-14) MURPHY M. ET AL.: Database accession no. L19183 XP002229496 abstract</p>	1-4
X	<p>DATABASE EBI 'Online! 18 April 1997 (1997-04-18) Database accession no. AA355954 XP002229499 abstract</p>	1-4
A	<p>DATABASE EBI 'Online! hypothetical protein, 1 July 1997 (1997-07-01) ALWAZZAN M. ET AL.: Database accession no. 000439 XP002229494 abstract</p>	1-4

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 01/02510

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE EBI 'Online! H. sapiens nucleobase transporter-like protein, 3 February 1999 (1999-02-03) HOGUE D.L. ET AL.: Database accession no. AF092511 XP002229497 abstract	1-4
A	DATABASE EBI 'Online! Human mRNA for GARS-AIRS-GART, 30 November 1990 (1990-11-30) AIMI J. ET AL.: Database accession no. X54199 XP002229498 abstract	1-4
A	DATABASE EBI 'Online! Human Flt3 ligand gene, 25 November 1995 (1995-11-25) LYMAN S.D. ET AL.: Database accession no. U29874 XP002229500 abstract	1-4
A	DATABASE EBI 'Online! H. sapiens mRNA for hypothetical protein , 30 May 1997 (1997-05-30) ALWZZAN M. ET AL.: Database accession no. Y10936 XP002229501 abstract -& ALWAZZAN M. ET AL.: "Six transcripts within 200 kilobases of the myotonic dystrophy expanded repeat" MAMMALIAN GENOME, vol. 9, 1998, pages 485-487, XP002229491	1-4
A	DATABASE EBI 'Online! Human parathyroid hormone-like protein (PLP)gene, 23 November 1989 (1989-11-23) Database accession no. M24350 XP002229503 abstract	
A	DATABASE EBI 'Online! Human clone 23745 mRNA, 14 December 1996 (1996-12-14) ANDERSSON B. ET AL.: Database accession no. U79260 XP002229504 abstract	1-4

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/JP 01/02510

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE EBI 'Online! Homo sapiens KIAA0040 mRNA, 22 December 1993 (1993-12-22) OHARA O. ET AL.: Database accession no. D25539 XP002229505 abstract & OHARA ET AL.: "Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. I. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1" DNA RESEARCH, vol. 1, 1994, pages 27-35,</p>	
A	<p>DATABASE EBI 'Online! Human protein kinase ATR mRNA, 10 November 1996 (1996-11-10) BENTLEY N.J. ET AL.: Database accession no. U76308 XP002229506 abstract</p>	
X	<p>DATABASE EBI 'Online! om21h06.s2 Soares NFL T GBC S1 H. sapiens cDNA , 16 April 1998 (1998-04-16) STRAUSBERG R. ET AL.: Database accession no. AA913875 XP002229507 abstract</p>	1-4
A	<p>DATABASE EBI 'Online! Homo sapiens mRNA for SCP-1, 7 October 1997 (1997-10-07) NISHINA Y. ET AL.: Database accession no. D67035 XP002229508 abstract & KONDOH N. ET AL.: "Assignment of synaptonemal complex protein 1 (SCP1) to human chromosome 1p13 by fluorescence in situ hybridization and its expression in the testis" CYTOGENETICS CELL GENETICS, vol. 78, 1997, pages 103-104,</p>	1-4

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte

onal Application No

T/DE 01/02510

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE EBI 'Online! H sapiens methyl-CpG binding protein 4(MBD4)gene, 19 August 1999 (1999-08-19) HENDRICH B. ET AL.: Database accession no. AF120998 XP002229509 abstract & HENDRICH B. ET AL.: "Genomic structure and chromosomal mapping of the murine and human Mbd1, Mbd2, Mbd3 and Mbd4 genes" MAMMALIAN GENOME, vol. 10, no. 9, 1999, pages 906-912, ----</p>	1-4
A	<p>DATABASE EBI 'Online! Human aC1 mRNA, 22 February 1997 (1997-02-22) ITO T. ET AL.: Database accession no. D82070 XP002229510 abstract & KITO K. ET AL.: "Fluorescent differential display analysis of gene expression in differentiating neuroblastoma cells" GENE, vol. 184, 1997, pages 73-81, -----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 01/02510

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.: **10 (in part)**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See supplemental sheet FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☒

No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, namely

1. Claims: 1-13 (in part)

Genes comprising coding mononucleotide microsatellites (cMNR) or dinucleotide microsatellites (cDNR), wherein the genes can be isolated from MSI+ tumour cells and differ from the corresponding genes from non-MSI+ (tumour) cells by mutations in the cMNR or cDNR and code for gene products comprising neopeptides, wherein the wt gene is OGT (Acc. No. U77413), and in particular contains the mutant gene SEQ ID 119 (see Figure 2/1); gene product consisting of the mutant gene and antibody against this product; method for identifying this gene by the use of primers SEQ ID 49-52 (see Table 1); kit comprising this gene or gene product or this antibody and/or a primer pair consisting of two from SEQ ID 49-52; use of the aforementioned gene, the gene product, the antibody against the gene product or the kit for the molecular examination of MSI+ tumours and their precursors as well as for their diagnosis, use of the gene in expressible form or the gene product for immunising an individual against MSI+ tumours and their precursors; method for identifying genes comprising cMNR or cDNR that can be isolated from MSI+ tumour cells, wherein the gene is OGT (Acc. No. U77413), wherein one searches for gene sequences containing cMNR or cDNR in data banks consisting of non-MSI+ (tumour) cells, uses these for finding the same genes in MSI+ tumour cells and selections the latter genes to the effect that they comprise mutations in the cMNR or cDNR when compared with the gene sequences from the non-MSI+ (tumour) cells and code for gene products comprising neopeptides.

2. Claims: 1-13 (in part)

Genes comprising coding mononucleotide microsatellites (cMNR) or dinucleotide microsatellites (cDNR), wherein the genes can be isolated from MSI+ tumour cells and differ from the corresponding genes from non-MSI+ (tumour) cells by mutations in the cMNR or cDNR and code for gene products comprising neopeptides, wherein the wt gene is HPDMPK (Acc. No. Y10936), and in particular contains the mutant gene SEQ ID 121, 122, 123 (see Figure 2/1), gene product consisting of the mutant gene and antibody against this product; method for identifying this gene by the use of primers SEQ ID 53-56 (see Table 1); kit comprising this gene or gene product or this antibody and/or a primer pair consisting of two from SEQ ID 53-56; use of the aforementioned gene, the gene product, the antibody against the gene product or the kit for the molecular examination of MSI+ tumours and their precursors as well as for their diagnosis,

use of the gene in expressable form or the gene product for immunising an individual against MSI+ tumours and their precursors; method for identifying genes comprising cMNR or cDNR that can be isolated from MSI+ tumour cells, wherein the gene is HPDMPK (Acc. No. Y10936), wherein one searches for gene sequences containing cMNR or cDNR in data banks consisting of non-MSI+ (tumour) cells, uses these for finding the same genes in MSI+ tumour cells and selections the latter genes to the effect that they comprise mutations in the cMNR or cDNR when compared with the gene sequences from the non-MSI+ (tumour) cells and code for gene products comprising neopeptides.

1.2. Claims: 1-13 (in part)

Genes comprising coding mononucleotide microsatellites (cMNR) or dinucleotide microsatellites (cDNR), wherein the genes can be isolated from MSI+ tumour cells and differ from the corresponding genes from non-MSI+ (tumour) cells by mutations in the cMNR or cDNR and code for gene products comprising neopeptides, wherein the wt gene is U79260 (Acc. No. U79260), gene product consisting of the mutant gene, wherein the product of the mutant gene contains in particular SEQ ID 124 and 125 (see Figure 2/1); and antibody against this product; method for identifying this gene by the use of primers SEQ ID 57-60 (see Table 1); kit comprising this gene or gene product or this antibody and/or a primer pair consisting of two from SEQ ID 57-60; use of the aforementioned gene, the gene product, the antibody against the gene product or the kit for the molecular examination of MSI+ tumours and their precursors as well as for their diagnosis; use of the gene in expressable form or the gene product for immunising an individual against MSI+ tumours and their precursors; method for identifying genes comprising cMNR or cDNR that can be isolated from MSI+ tumour cells, wherein the gene is Acc. No. U79260, wherein one searches for gene sequences containing cMNR or cDNR in data banks consisting of non-MSI+ (tumour) cells, uses these for finding the same genes in MSI+ tumour cells and selections the latter genes to the effect that they comprise mutations in the cMNR or cDNR when compared with the gene sequences from the non-MSI+ (tumour) cells and code for gene products comprising neopeptides.

2. Claims: 1-13 (in part)

Genes comprising coding mononucleotide microsatellites (cMNR) or dinucleotide microsatellites (cDNR), wherein the genes can be isolated from MSI+ tumour cells and differ from the corresponding genes from non-MSI+ (tumour) cells by mutations in the cMNR or cDNR and code for gene products comprising neopeptides, wherein the wt gene is FLT3LG (Acc. No. U29874), and in particular contains the mutant gene SEQ ID 107 (see Figure 2/1); gene product consisting of the mutant gene and antibody against this product; method for identifying this gene by the use of primers SEQ ID 1-4 (see Table 1); kit

comprising this gene or gene product of this antibody and/or a primer pair consisting of two from SEQ ID 1-4; use of the aforementioned gene, the gene product, the antibody against the gene product or the kit for the molecular examination of MSI+ tumours and their precursors as well as for their diagnosis, use of the gene in expressible form or the gene product for immunising an individual against MSI+ tumours and their precursors; method for identifying genes comprising cMNR or cDNR that can be isolated from MSI+ tumour cells, wherein the gene is FLT3LG (Acc. No. U29874), wherein one searches for gene sequences containing cMNR or cDNR in data banks consisting of non-MSI+ (tumour) cells, uses these for finding the same genes in MSI+ tumour cells and selections the later genes to the effect that they comprise mutations in the cMNR or cDNR when compared with the gene sequences from the non-MSI+ (tumour) cells and code for gene products comprising neopeptides.

Please note that all the inventions specified under point 1, though not necessarily linked by a common inventive concept, could be searched in full without entailing added effort that would have justified an additional searched fee.

Continuation of Box I.2.

Claim 10 (in part)

Claim 10 is unclear (PCT Article 6) since it relates to "representatives" without defining such gene, gene products, antibody and primer pair representatives by any technical features: a person skilled in the art is therefore not able to unambiguously determine the scope of protection of the claim.

It is therefore not possible to carry out a meaningful search covering the full scope of protection of the claim.

The search is therefore directed towards the parts of the scope of the claim which, in the light of the description, are clear, namely kits which comprise the peptide sequence (and nucleotide sequence coding therefor) designated in Figure 2/1 as "neo", antibody against this sequence and/or the entire primers of Table 1 (that is oligonucleotides consisting of the sequences listed in Table 1).

The applicant is advised that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 01/02510

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5741650	A	21-04-1998	AU 704696 B2	29-04-1999
			AU 2240697 A	22-08-1997
			CA 2215263 A1	07-08-1997
			EP 0817968 A1	14-01-1998
			JP 2002515973 T	28-05-2002
			US 5952178 A	14-09-1999
			WO 9728450 A1	07-08-1997
			US 6303304 B1	16-10-2001
			US 2002119472 A1	29-08-2002
WO 0212328	A	14-02-2002	AU 8098201 A	18-02-2002
			WO 0212328 A2	14-02-2002
			US 2002131971 A1	19-09-2002

INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/02510

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/68 C07K14/47

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, SEQUENCE SEARCH, MEDLINE, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	AKIMOTO YOSHIHIRO ET AL: "Localization of the O-linked N-acetylglucosamine transferase in rat pancreas." DIABETES, Bd. 48, Nr. 12, Dezember 1999 (1999-12), Seiten 2407-2413, XP001120467 ISSN: 0012-1797 Zusammenfassung, S. 2408, Spalte 1, "Antibodies" --- -/--	5



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

31. Januar 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

19.03.03

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Luzzatto, E

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MIRONOV N ET AL: "A novel sensitive method to detect frameshift mutations in exonic repeat sequences of cancer-related genes." CARCINOGENESIS. ENGLAND NOV 1999, Bd. 20, Nr. 11, November 1999 (1999-11), Seiten 2189-2192, XP002229558 ISSN: 0143-3334 das ganze Dokument	1-4,11
X	DATABASE EBI 'Online! RC1-HT0256-271099-011-d07 HT0256 H. sapiens cDNA, 6. Februar 2000 (2000-02-06) SIMPSON A.J.G.: "The FAPESP/LICR human cancer genome project" Database accession no. AW379874 XP002229502 Zusammenfassung	1-4
X	RICCIO A ET AL: "The DNA repair gene MBD4 (MED1) is mutated in human carcinomas with microsatellite instability." NATURE GENETICS. UNITED STATES NOV 1999, Bd. 23, Nr. 3, November 1999 (1999-11), Seiten 266-268, XP002229559 ISSN: 1061-4036 das ganze Dokument	1-4,11
A	OUYANG H ET AL: "The insulin-like growth factor II receptor gene is mutated in genetically unstable cancers of the endometrium, stomach, and colorectum." CANCER RESEARCH. UNITED STATES 15 MAY 1997, Bd. 57, Nr. 10, 15. Mai 1997 (1997-05-15), Seiten 1851-1854, XP001119572 ISSN: 0008-5472 Zusammenfassung	6
A	CALIN G ET AL: "The coding region of the Bloom syndrome BLM gene and of the CBL proto-oncogene is mutated in genetically unstable sporadic gastrointestinal tumors." CANCER RESEARCH. UNITED STATES 1 SEP 1998, Bd. 58, Nr. 17, 1. September 1998 (1998-09-01), Seiten 3777-3781, XP001120180 ISSN: 0008-5472 das ganze Dokument	6,7,9
A	US 5 741 650 A (LAPIDUS STANLEY N ET AL) 21. April 1998 (1998-04-21) Spalte 16, Zeile 6 - Zeile 60	6,7,9

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>FURUTA K ET AL: "GENE MUTATION OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA1 TYPE II RECEPTOR IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, NEW YORK, NY, US, Bd. 81, Nr. 6, 11. Juni 1999 (1999-06-11), Seiten 851-853, XP001085381 ISSN: 0020-7136 Zusammenfassung</p> <p>---</p>	1
A	<p>DUVAL A ET AL: "VARIABLE MUTATION FREQUENCIES IN CODING REPEATS OF TCF-4 AND OTHER TARGET GENES IN COLON, GASTRIC AND ENDOMETRIAL CARCINOMA SHOWING MICROSATELLITE INSTABILITY" ONCOGENE, BASINGSTOKE, HANTS, GB, Bd. 18, Nr. 48, 18. November 1999 (1999-11-18), Seiten 6806-6809, XP000882123 ISSN: 0950-9232 Zusammenfassung; Abbildungen 1,2</p> <p>---</p>	1
A	<p>PERCESEPE A ET AL: "Genomic instability and target gene mutations in colon cancers with different degrees of allelic shifts." GENES, CHROMOSOMES & CANCER. UNITED STATES APR 2000, Bd. 27, Nr. 4, April 2000 (2000-04), Seiten 424-429, XP002221119 ISSN: 1045-2257 Zusammenfassung; Tabelle 2</p> <p>---</p>	1
A	<p>RAMPINO ET AL: "Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, Bd. 275, 14. Februar 1997 (1997-02-14), Seiten 967-969, XP002092054 ISSN: 0036-8075 Zusammenfassung</p> <p>---</p>	1
A	<p>SAKAO YUKINORI ET AL: "Microsatellite instability and frameshift mutations in the bax gene hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma." JAPANESE JOURNAL OF CANCER RESEARCH, Bd. 89, Nr. 10, Oktober 1998 (1998-10), Seiten 1020-1027, XP002221572 ISSN: 0910-5050 Zusammenfassung; Tabelle 4</p> <p>---</p>	1,5

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DATABASE EBI 'Online! Synaptonemal complex protein 1, 15. Juli 1998 (1998-07-15) Database accession no. q15431 XP002229492 Zusammenfassung & MEUWISSEN R.L.J. ET AL.: "Human synaptonemal complex protein 1 (SCP1): isolation and characterization of the cDNA and chromosomal localization of the gene" GENOMICS, Bd. 39, 1997, Seiten 377-384,</p>	
A	<p>DATABASE EBI 'Online! Methyl-Cpg binding protein MBD4, 1. Mai 1999 (1999-05-01) HENDRICH B. ET AL.: Database accession no. 095243 XP002229493 Zusammenfassung</p>	1-4
L	<p>DATABASE EBI 'Online! sequence 370 from patent W00212328, 18. Mai 2002 (2002-05-18) Database accession no. AX396155 XP002229495 (erwähnt, um Information über die in WO-A-0212328 offenbarte relevante Sequenz zu geben) Zusammenfassung & WO 02 12328 A (CORIXA CORP.) 14. Februar 2002 (2002-02-14)</p>	1-4
A	<p>DATABASE EBI 'Online! Human MAC30 mRNA, 3' end, 14. Juli 1993 (1993-07-14) MURPHY M. ET AL.: Database accession no. L19183 XP002229496 Zusammenfassung</p>	1-4
X	<p>DATABASE EBI 'Online! 18. April 1997 (1997-04-18) Database accession no. AA355954 XP002229499 Zusammenfassung</p>	1-4
A	<p>DATABASE EBI 'Online! hypothetical protein, 1. Juli 1997 (1997-07-01) ALWAZZAN M. ET AL.: Database accession no. 000439 XP002229494 Zusammenfassung</p>	1-4
	-/--	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DATABASE EBI 'Online! H. sapiens nucleobase transporter-like protein, 3. Februar 1999 (1999-02-03) HOGUE D.L. ET AL.: Database accession no. AF092511 XP002229497 Zusammenfassung</p>	1-4
A	<p>DATABASE EBI 'Online! Human mRNA for GARS-AIRS-GART, 30. November 1990 (1990-11-30) AIMI J. ET AL.: Database accession no. X54199 XP002229498 Zusammenfassung</p>	1-4
A	<p>DATABASE EBI 'Online! Human Flt3 ligand gene, 25. November 1995 (1995-11-25) LYMAN S.D. ET AL.: Database accession no. U29874 XP002229500 Zusammenfassung</p>	1-4
A	<p>DATABASE EBI 'Online! H. sapiens mRNA for hypothetical protein , 30. Mai 1997 (1997-05-30) ALWZZAN M. ET AL.: Database accession no. Y10936 XP002229501 Zusammenfassung -& ALWAZZAN M. ET AL.: "Six transcripts within 200 kilobases of the myotonic dystrophy expanded repeat" MAMMALLIAN GENOME, Bd. 9, 1998, Seiten 485-487, XP002229491</p>	1-4
A	<p>DATABASE EBI 'Online! Human parathyroid hormone-like protein (PLP)gene, 23. November 1989 (1989-11-23) Database accession no. M24350 XP002229503 Zusammenfassung</p>	
A	<p>DATABASE EBI 'Online! Human clone 23745 mRNA, 14. Dezember 1996 (1996-12-14) ANDERSSON B. ET AL.: Database accession no. U79260 XP002229504 Zusammenfassung</p>	1-4

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DATABASE EBI 'Online! Homo sapiens KIAA0040 mRNA, 22. Dezember 1993 (1993-12-22) OHARA O. ET AL.: Database accession no. D25539 XP002229505 Zusammenfassung & OHARA ET AL.: "Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. I. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1" DNA RESEARCH, Bd. 1, 1994, Seiten 27-35,</p>	
A	<p>DATABASE EBI 'Online! Human protein kinase ATR mRNA, 10. November 1996 (1996-11-10) BENTLEY N.J. ET AL.: Database accession no. U76308 XP002229506 Zusammenfassung</p>	
X	<p>DATABASE EBI 'Online! om21h06.s2 Soares NFL T GBC S1 H. sapiens cDNA , 16. April 1998 (1998-04-16) STRAUSBERG R. ET AL.: Database accession no. AA913875 XP002229507 Zusammenfassung</p>	1-4
A	<p>DATABASE EBI 'Online! Homo sapiens mRNA for SCP-1, 7. Oktober 1997 (1997-10-07) NISHINA Y. ET AL.: Database accession no. D67035 XP002229508 Zusammenfassung & KONDOH N. ET AL.: "Assignment of synaptonemal complex protein 1 (SCP1) to human chromosome 1p13 by fluorescence in situ hybridization and its expression in the testis" CYTOGENETICS CELL GENETICS, Bd. 78, 1997, Seiten 103-104,</p>	1-4

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DATABASE EBI 'Online! H sapiens methyl-CpG binding protein 4(MBD4)gene, 19. August 1999 (1999-08-19) HENDRICH B. ET AL.: Database accession no. AF120998 XP002229509 Zusammenfassung & HENDRICH B. ET AL.: "Genomic structure and chromosomal mapping of the murine and human Mbd1, Mbd2, Mbd3 and Mbd4 genes" MAMMALIAN GENOME, Bd. 10, Nr. 9, 1999, Seiten 906-912, ---</p>	1-4
A	<p>DATABASE EBI 'Online! Human aC1 mRNA, 22. Februar 1997 (1997-02-22) ITO T. ET AL.: Database accession no. D82070 XP002229510 Zusammenfassung & KITO K. ET AL.: "Fluorescent differential display analysis of gene expression in differentiating neuroblastoma cells" GENE, Bd. 184, 1997, Seiten 73-81, -----</p>	

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. **10 (teilweise)**
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☒ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☒ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-13 (teilweise)

Gene mit kodierenden Mononukleotid-Mikrosatelliten (cMNR) oder Dinukleotid-Mikrosatelliten (cDNR), wobei die Gene aus MSI+-Tumorzellen isolierbar sind und sich von den entsprechenden Genen aus nicht-MSI+ (Tumor) zellen durch Mutationen in den cMNR oder cDNR unterscheiden und für Neo Peptide umfassende Genprodukte kodieren, wobei das wt Gen OGT (Acc. N. U77413) ist, und wobei insbesondere das mutierte Gen SEQ ID 119 enthält (siehe Fig 2/1); Genprodukt aus dem mutierten Gen und Antikörper gegen dieses Produkt; Verfahren zur Identifizierung dieses Gens durch die Verwendung von Primers SEQ ID 49-52 (siehe Tab. 1); Kit, umfassend dieses Gen oder Genprodukt oder diesen Antikörper und/oder ein Primerpaar bestehend aus zwei von SEQ ID 49-52; Verwendung des oben genannten Gens, des Genprodukts, der Antikörper gegen das Genprodukt oder der Kits zur molekularen Untersuchung von MSI+-Tumoren und ihren Vorstufen sowie zu deren Diagnose, Verwendung des Gens in exprimierbarer Form oder des Genprodukts zur Immunisierung eines Individuums gegen MSI+-Tumore und ihre Vorstufen; Verfahren zur Identifizierung von aus MSI+-Tumorzellen isolierbaren Genen mit cMNR oder cDNR, wobei das Gen OGT (Acc N. U77413 ist) bei dem man in Datenbanken von nicht MSI+ (Tumor) zellen nach cMNR oder cDNR enthaltenden Gen Sequenzen sucht, diese zur Auffindung gleicher Gene in MSI+ Tumorzellen verwendet und letztere Gene dahingehend selektioniert, dass sie gegenüber den Gen-Sequenzen aus den nicht-MSI+ (Tumor)zellen Mutationen in den cMNR oder cDNR aufweisen und für Neo-Peptide umfassende Genprodukte kodieren.

1.1. Ansprüche: 1-13 (teilweise)

Gene mit kodierenden Mononukleotid-Mikrosatelliten (cMNR) oder Dinukleotid-Mikrosatelliten (cDNR), wobei die Gene aus MSI+-Tumorzellen isolierbar sind und sich von den entsprechenden Genen aus nicht-MSI+ (Tumor) zellen durch Mutationen in den cMNR oder cDNR unterscheiden und für Neo Peptide umfassende Genprodukte kodieren, wobei das wt Gen HPDMPK (Acc. N. Y10936) ist, und wobei insbesondere das mutierte Gen SEQ ID 121,122,123 enthält (siehe Fig 2/1), Genprodukt aus dem mutierten Gen und Antikörper gegen dieses Produkt, Verfahren zur Identifizierung dieses Gens durch die Verwendung von Primers SEQ ID 53-56 (siehe Tab. 1), Kit, umfassend dieses Gen oder Genprodukt oder diesen Antikörper und/oder ein Primerpaar bestehend aus zwei von SEQ ID 53-56, Verwendung des oben genannten Gens, des Genprodukts, der Antikörper gegen das Genprodukt oder der Kits zur molekularen

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Untersuchung von MSI+-Tumoren und ihren Vorstufen sowie zu deren Diagnose, Verwendung des Gens in exprimierbarer Form oder des Genprodukts zur Immunisierung eines Individuums gegen MSI+-Tumore und ihre Vorstufen; Verfahren zur Identifizierung von aus MSI+-Tumorzellen isolierbaren Genen mit cMNR oder cDNR, wobei das Gen HPDMPK (Acc N. Y10936 ist) bei dem man in Datenbanken von nicht MSI+ (Tumor) zellen nach cMNR oder cDNR enthaltenden Gen Sequenzen sucht, diese zur Auffindung gleicher Gene in MSI+ Tumorzellen verwendet und letztere Gene dahingehend selektioniert, dass sie gegenüber den Gen-Sequenzen aus den nicht-MSI+ (Tumor)zellen Mutationen in den cMNR oder cDNR aufweisen und für Neo-Peptide umfassende Genprodukte kodieren.

1.2. Ansprüche: 1-13 (teilweise)

Gene mit kodierenden Mononukleotid-Mikrosatelliten (cMNR) oder Dinukleotid-Mikrosatelliten (cDNR), wobei die Gene aus MSI+-Tumorzellen isolierbar sind und sich von den entsprechenden Genen aus nicht-MSI+ (Tumor) zellen durch Mutationen in den cMNR oder cDNR unterscheiden und für Neo Peptide umfassende Genprodukte kodieren, wobei das wt Gen U79260 (Acc. N. U79260) ist, Genprodukt aus dem mutierten Gen, wobei das Produkt des mutierten Gens insbesondere SEQ ID 124 und 125 enthält (siehe Fig 2/1); und Antikörper gegen dieses Produkt; Verfahren zur Identifizierung dieses Gens durch die Verwendung von Primers SEQ ID 57-60 (siehe Tab. 1); Kit, umfassend dieses Gen oder Genprodukt oder diesen Antikörper und/oder ein Primerpaar bestehend aus zwei von SEQ ID 57-60; Verwendung des oben genannten Gens, des Genprodukts, der Antikörper gegen das Genprodukt oder der Kits zur molekularen Untersuchung von MSI+-Tumoren und ihren Vorstufen sowie zu deren Diagnose; Verwendung des Gens in exprimierbarer Form oder des Genprodukts zur Immunisierung eines Individuums gegen MSI+-Tumore und ihre Vorstufen; Verfahren zur Identifizierung von aus MSI+-Tumorzellen isolierbaren Genen mit cMNR oder cDNR, wobei das Gen Acc N. U79260 ist, bei dem man in Datenbanken von nicht MSI+ (Tumor) zellen nach cMNR oder cDNR enthaltenden Gen Sequenzen sucht, diese zur Auffindung gleicher Gene in MSI+ Tumorzellen verwendet und letztere Gene dahingehend selektioniert, dass sie gegenüber den Gen-Sequenzen aus den nicht-MSI+ (Tumor)zellen Mutationen in den cMNR oder cDNR aufweisen und für Neo-Peptide umfassende Genprodukte kodieren.

2. Ansprüche: 1-13 (teilweise)

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Gene mit kodierenden Mononukleotid-Mikrosatelliten (cMNR) oder Dinukleotid-Mikrosatelliten (cDNR), wobei die Gene aus MSI+-Tumorzellen isolierbar sind und sich von den entsprechenden Genen aus nicht-MSI+ (Tumor) zellen durch Mutationen in den cMNR oder cDNR unterscheiden und für Neo Peptide umfassende Genprodukte kodieren, wobei das wt Gen FLT3LG (Acc. N. U29874) ist, und wobei insbesondere das mutierte Gen SEQ ID 107 enthält (siehe Fig 2/1); Genprodukt aus dem mutierten Gen und Antikörper gegen dieses Produkt; Verfahren zur Identifizierung dieses Gens durch die Verwendung von Primers SEQ ID 1-4 (siehe Tab. 1); Kit, umfassend dieses Gen oder Genprodukt oder diesen Antikörper und/oder ein Primerpaar bestehend aus zwei von SEQ ID 1-4, Verwendung des oben genannten Gens, des Genprodukts, der Antikörper gegen das Genprodukt oder der Kits zur molekularen Untersuchung von MSI+-Tumoren und ihren Vorstufen sowie zu deren Diagnose; Verwendung des Gens in exprimierbarer Form oder des Genprodukts zur Immunisierung eines Individuums gegen MSI+-Tumore und ihre Vorstufen; Verfahren zur Identifizierung von aus MSI+-Tumorzellen isolierbaren Genen mit cMNR oder cDNR, wobei das Gen FLT3LG (Acc N. U29874 ist), bei dem man in Datenbanken von nicht MSI+ (Tumor) zellen nach cMNR oder cDNR enthaltenden Gen Sequenzen sucht, diese zur Auffindung gleicher Gene in MSI+ Tumorzellen verwendet und letztere Gene dahingehend selektioniert, dass sie gegenüber den Gen-Sequenzen aus den nicht-MSI+ (Tumor)zellen Mutationen in den cMNR oder cDNR aufweisen und für Neo-Peptide umfassende Genprodukte kodieren.

Bitte zu beachten daß für alle unter Punkt 1 aufgeführten Erfindungen, obwohl diese nicht unbedingt durch ein gemeinsames erfinderisches Konzept verbunden sind, ohne Mehraufwand der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, eine vollständige Recherche durchgeführt werden konnte.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 10 (teilweise)

Anspruch 10 ist unklar (Art. 6 PCT), weil er sich auf "Vertreter" bezieht, ohne jedoch solche Gen-, Genprodukte-, Antikörper-, Primerpaar-Vertreter durch irgendwelche technische Merkmale zu definieren: der Fachmann ist somit nicht in der Lage den Schutzzumfang des Anspruchs unzweideutig zu bestimmen. Eine sinnvolle Recherche bezüglich des ganzen Schutzzumfangs des Anspruchs ist somit undurchführbar. Daher wurde die Recherche auf die Teile des Anspruchsumfangs gerichtet, die, im Lichte der Beschreibung, klar sind, nämlich Kits, die die im Fig. 2/1 als "neo" bezeichnete Peptidsequenz (und dafür kodierende Nukleotidsequenz), Antikörper gegen diese Sequenz und/oder die vollständigen Primers der Tabelle 1 (d.h. Oligonukleotide, die aus der in Tabelle 1 aufgelisteten Sequenzen bestehen) umfassen.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die derselben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/02510

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5741650 A	21-04-1998	AU 704696 B2	29-04-1999
		AU 2240697 A	22-08-1997
		CA 2215263 A1	07-08-1997
		EP 0817968 A1	14-01-1998
		JP 2002515973 T	28-05-2002
		US 5952178 A	14-09-1999
		WO 9728450 A1	07-08-1997
		US 6303304 B1	16-10-2001
		US 2002119472 A1	29-08-2002
WO 0212328 A	14-02-2002	AU 8098201 A	18-02-2002
		WO 0212328 A2	14-02-2002
		US 2002131971 A1	19-09-2002

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)